

PCT/JP 03/12037

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

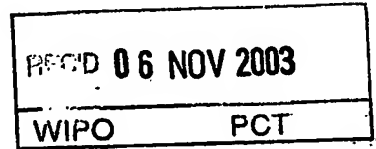
19.09.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2002年 9月27日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2002-282345  
[ST. 10/C]: [JP2002-282345]



出 願 人  
Applicant(s): 佐藤 昇志  
住友製薬株式会社

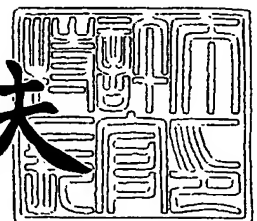
PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

2003年10月24日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願  
【整理番号】 133016  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 5/00  
A61K 35/12

## 【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市豊平区福住 2 条 9 丁目 1 3 - 3

【氏名】 佐藤 昇志

## 【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市中央区北 3 条西 1 8 丁目 2 の 1

【氏名】 塚原 智英

## 【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市西区二十四軒 2 条 2 丁目 1 - 5 - 1 0

【氏名】 鍋田 裕樹

## 【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市豊平区西岡 2 条 1 1 丁目 1 1 - 1 3

【氏名】 川口 哲

## 【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市北区北 3 8 条西 5 丁目 1 - 4 0 - 3 0 6

【氏名】 池田 英之

## 【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市中央区南 2 0 条西 1 0 丁目 1 - 8

【氏名】 和田 卓郎

## 【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市中央区南 1 1 条西 2 0 丁目 2 - 6 啓明 1  
1 条シティハウス 1 0 0 1 号

【氏名】 山下 敏彦

## 【特許出願人】

【住所又は居所】 北海道札幌市豊平区福住2条9丁目13-3

【氏名又は名称】 佐藤 昇志

## 【特許出願人】

【識別番号】 000183370

【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

## 【代理人】

【識別番号】 100121588

【弁理士】

【氏名又は名称】 五十部 穰

【電話番号】 06-6466-5214

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 056546

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0205876

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 腫瘍抗原タンパク質及びその利用

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質を有効成分として含有してなるCTLの誘導剤。

【請求項 2】 請求項 1 記載のタンパク質の部分ペプチドであって、かつHLA抗原と結合してCTLにより認識されるペプチド。

【請求項 3】 HLA抗原がHLA-A24 またはHLA-B55 である、請求項 2 記載のペプチド。

【請求項 4】 請求項 2 または 3 に記載のペプチドを含有するペプチド。

【請求項 5】 請求項 2 ～ 4 のいずれかに記載のペプチドを有効成分として含有してなるCTLの誘導剤。

【請求項 6】 請求項 1 記載のタンパク質をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドを含有する核酸を含有してなるCTLの誘導剤。

【請求項 7】 ポリヌクレオチドが配列番号：1、配列番号：1 の第337 位～第1878 位、または配列番号：3 に記載の塩基配列を含有するポリヌクレオチドである、請求項 6 記載のCTLの誘導剤。

【請求項 8】 請求項 2 ～ 4 のいずれかに記載のペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドを含有する核酸。

【請求項 9】 請求項 8 記載の核酸を含有してなるCTLの誘導剤。

【請求項 10】 請求項 1 記載のタンパク質、請求項 5 記載のペプチド、もしくは請求項 6 または 9 に記載の核酸と、抗原提示能を有する細胞とをイン・ビトロで接触させることを特徴とする、抗原提示細胞の製造方法。

【請求項 11】 請求項 10 に記載の製造方法により製造される抗原提示細胞。

【請求項 12】 請求項 1 記載のタンパク質、請求項 5 記載のペプチド、もしくは請求項 6 または 9 に記載の核酸と、末梢血リンパ球とをイン・ビトロで接触させることを特徴とする、CTLの誘導方法。



【請求項 13】 請求項 12 記載の誘導方法により誘導される CTL。

【請求項 14】 請求項 6 記載のポリヌクレオチドの塩基配列において、連続する少なくとも 15 塩基を含有するポリヌクレオチド及び／または該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドからなる腫瘍マーカー。

【請求項 15】 配列番号：1 または配列番号：3 に記載の塩基配列において、連続する少なくとも 15 塩基を含有するポリヌクレオチド及び／または該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドからなる、請求項 14 記載の腫瘍マーカー。

【請求項 16】 請求項 1 記載のタンパク質のアミノ酸配列において、連続する少なくとも 8 アミノ酸を含有するポリペプチドからなる腫瘍マーカー。

【請求項 17】 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列において、連続する少なくとも 8 アミノ酸を含有するポリペプチドからなる、請求項 16 記載の腫瘍マーカー。

【請求項 18】 請求項 1 記載のタンパク質に対する抗体からなる腫瘍マーカー。

【請求項 19】 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質に対する抗体からなる、請求項 18 記載の腫瘍マーカー。

【請求項 20】 腫瘍が肉腫である、請求項 14～19 いずれか記載の腫瘍マーカー。

【請求項 21】 請求項 14～20 いずれか記載の腫瘍マーカーを含有してなる腫瘍の診断薬。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は、腫瘍抗原タンパク質に関する。さらに詳しくは、本発明は、肉腫細胞由来の腫瘍抗原タンパク質およびその遺伝子の、癌免疫分野における利用などに関する。

##### 【0002】

#### 【従来の技術】

生体による腫瘍細胞やウイルス感染細胞等の排除には細胞性免疫、とりわけ細胞傷害性T細胞（CTLと称する）が重要な働きをしている。CTLは、腫瘍細胞上の抗原ペプチド（腫瘍抗原ペプチド）とMHC（Major Histocompatibility Complex）クラスI抗原（ヒトの場合はHLA抗原と称する）との複合体を認識し、腫瘍細胞を攻撃・破壊する。

#### 【0003】

腫瘍抗原ペプチドは、腫瘍に特有のタンパク質、すなわち腫瘍抗原タンパク質が細胞内で合成された後、プロテアーゼにより細胞内で分解されることによって生成される。生成された腫瘍抗原ペプチドは、小胞体内でMHCクラスI抗原（HLA抗原）と結合して複合体を形成し、細胞表面に運ばれて抗原提示される。この抗原提示された複合体を腫瘍特異的なCTLが認識し、細胞傷害作用やリンフォカインの産生を介して抗腫瘍効果を示す。このような一連の作用の解明に伴い、腫瘍抗原タンパク質または腫瘍抗原ペプチドをいわゆる癌免疫療法剤（癌ワクチン）として利用することにより、腫瘍患者の体内の腫瘍特異的なCTLを増強させる治療法が可能となった。

#### 【0004】

腫瘍抗原タンパク質は、Immunity, vol.10:281, 1999（非特許文献1）のtableに記載のものが代表例として挙げられる。具体的にはメラノサイト組織特異的なタンパク質であるgp100（J.Exp.Med., 179:1005, 1994）、MART-1（Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 91:3515, 1994）、およびチロシナーゼ（J.Exp.Med., 178:489, 1993）などのメラノソーム抗原、メラノーマ以外の腫瘍抗原タンパク質としてはHER2/neu（J.Exp.Med., 181:2109, 1995）、CEA（J.Natl.Cancer.Inst., 87:982, 1995）、およびPSA（J.Natl.Cancer.Inst., 89:293, 1997）などの腫瘍抗原タンパク質が挙げられる。しかしながら、骨肉腫等の肉腫に対して幅広く適用可能な腫瘍抗原タンパク質は、未だ見出されていない。

#### 【0005】

パピローマウイルスのE2結合部位を認識する因子として、パピローマウイルス結合因子(Papillomavirus binding factor: PBF、GenBank データベース Accession No. AF263928) が同定されている（Virology 293, 103-117, 2002（非特許文

献2))。しかしながら、該PBFと腫瘍抗原との関係は何も知られていない。

【非特許文献1】

Immunity, vol.10: 281, 1999

【非特許文献2】

Virology, 293, 103-117, 2002

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、肉腫細胞由来の腫瘍抗原タンパク質およびその遺伝子の、癌免疫分野における利用などを提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、骨肉腫患者由来の骨肉種細胞株 OS2000を樹立し、また該OS2000に対して細胞傷害活性を有するCTL株 TcOS2000cl-303を樹立した。

続いてアッセイ用細胞として、293-EBNA細胞にHLA-B5502遺伝子 (HLA-B55の1種) を導入した293-EBNA-B55細胞、および293-EBNA細胞にHLA-A2402遺伝子 (HLA-A24の1種) を導入した293-EBNA-A24細胞を作製した。これら293-EBNA-B55細胞または293-EBNA-A24細胞に対して、OS2000から調製したcDNAライブラリーのcDNAクローンプールをトランスフェクトし、そのトランスフェクタントにTcOS2000cl-303を作用させ、TcOS2000cl-303が反応したか否かを、TcOS2000cl-303が有する細胞傷害活性により遊離したLDH量を測定することにより検討した。膨大なスクリーニングを繰り返した結果、最終的に、GenBank Accession No. AF263928として登録されているパピローマウイルス結合因子 (Papillomavirus binding factor: PBF) (配列番号: 1及び2) が、CTL誘導活性を有する新規な腫瘍抗原タンパク質であることを見出すに至った。当該PBFが腫瘍抗原タンパク質としての機能を有することは従来は全く知られておらず、また予想もされていなかった新規な知見である。

【0008】

本発明において見出された腫瘍抗原タンパク質PBFまたはその遺伝子は、in vivoまたはin vitroにおいてCTLの誘導剤として用いることができ、骨肉腫等の肉

腫に対して治療または改善効果を発揮することが期待される。さらに当該PBFは、肉腫において幅広く高発現していることから、肉腫に対する腫瘍マーカーとしても有用であると考えられる。

本発明は、以上のような知見に基づき完成するに至ったものである。

【0009】

すなわち本発明は、

- (1) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質を有効成分として含有してなるCTLの誘導剤、
- (2) 前記(1)記載のタンパク質の部分ペプチドであって、かつHLA抗原と結合してCTLにより認識されるペプチド、
- (3) HLA抗原がHLA-A24またはHLA-B55である、前記(2)記載のペプチド、
- (4) 前記(2)または(3)に記載のペプチドを含有するペプチド、
- (5) 前記(2)～(4)のいずれかに記載のペプチドを有効成分として含有してなるCTLの誘導剤、
- (6) 前記(1)記載のタンパク質をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドを含有する核酸を含有してなるCTLの誘導剤、
- (7) ポリヌクレオチドが配列番号：1、配列番号：1の第337位～第1878位、または配列番号：3に記載の塩基配列を含有するポリヌクレオチドである、前記(6)記載のCTLの誘導剤、
- (8) 前記(2)～(4)のいずれかに記載のペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドを含有する核酸、
- (9) 前記(8)記載の核酸を含有してなるCTLの誘導剤、
- (10) 前記(1)記載のタンパク質、前記(5)記載のペプチド、もしくは前記(6)または(9)に記載の核酸と、抗原提示能を有する細胞とをイン・ビトロで接触させることを特徴とする、抗原提示細胞の製造方法、
- (11) 前記(10)に記載の製造方法により製造される抗原提示細胞、
- (12) 前記(1)記載のタンパク質、前記(5)記載のペプチド、もしくは前記(6)または(9)に記載の核酸と、末梢血リンパ球とをイン・ビトロで接触

させることを特徴とする、CTLの誘導方法、

(13) 前記(12)記載の誘導方法により誘導されるCTL、

(14) 前記(6)記載のポリヌクレオチドの塩基配列において、連続する少なくとも15塩基を含有するポリヌクレオチド及び／または該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドからなる腫瘍マーカー、

(15) 配列番号：1または配列番号：3に記載の塩基配列において、連続する少なくとも15塩基を含有するポリヌクレオチド及び／または該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドからなる、前記(14)記載の腫瘍マーカー、

(16) 前記(1)記載のタンパク質のアミノ酸配列において、連続する少なくとも8アミノ酸を含有するポリペプチドからなる腫瘍マーカー、

(17) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列において、連続する少なくとも8アミノ酸を含有するポリペプチドからなる、前記(16)記載の腫瘍マーカー、

(18) 前記(1)記載のタンパク質に対する抗体からなる腫瘍マーカー、

(19) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質に対する抗体からなる、前記(18)記載の腫瘍マーカー、

(20) 腫瘍が肉腫である、前記(14)～(19)いずれか記載の腫瘍マーカー、

(21) 前記(14)～(20)いずれか記載の腫瘍マーカーを含有してなる腫瘍の診断薬、

(22) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質が、以下の(a)～(c)：

(a) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列を含有するタンパク質、

(b) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含有するタンパク質であって、かつ当該タンパク質を発現させた細胞がCTLにより認識される特徴を有するタンパク質、

(c) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列と70%以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を含有するタンパク質であって、かつ当該タンパク質を発現させた細胞がCTLにより認識される特徴を有するタンパク質、

のいずれかである、前記(1)記載のCTLの誘導剤、

(23) 前記(1)記載のタンパク質をコードする塩基配列からなるポリヌクレチドが、以下の(a)~(g):

(a) 配列番号: 1に記載の塩基配列を含有するポリヌクレオチド、

(b) 配列番号: 1に記載の塩基配列の第337位~第1878位を含有するポリヌクレオチド、

(c) 配列番号: 2に記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、

(d) 配列番号: 3に記載の塩基配列を含有するポリヌクレオチド、

(e) 前記(a)~(d)のいずれかのポリヌクレチドの相補鎖に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、かつ当該ポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質を発現させた細胞がCTLに認識される特徴を有するポリヌクレオチド、

(f) 前記(a)~(d)のいずれかのポリヌクレオチドと70%以上の配列同一性を示す塩基配列を含有するポリヌクレオチドであって、かつ当該ポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質を発現させた細胞がCTLに認識される特徴を有するポリヌクレオチド、

(g) 前記(a)~(d)のいずれかのポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び/又は付加されたアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、かつ当該ポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質を発現させた細胞がCTLに認識される特徴を有するポリヌクレオチド、

のいずれかである、前記(6)記載のCTLの誘導剤、ならびに

(24) 癌ワクチンとして使用される、前記(1)、(5)、(6)、(7)または(9)に記載のCTLの誘導剤、に関する。

#### 【0010】

#### 【発明の実施の形態】

##### 1) 本発明のタンパク質

本発明のCTLの誘導剤に含有されるタンパク質(以下、本発明のタンパク質と称する場合がある)は、配列番号: 2に記載のアミノ酸配列と同一または実質

的に同一のアミノ酸配列を含有する。本発明のタンパク質は、天然物（例えば骨肉種細胞株）に由来するタンパク質であってもよく、また組換えタンパク質であっても良い。

#### 【0011】

ここで配列番号：2に記載のアミノ酸配列は、GenBank データベースにおいて Accession No. AF263928として登録されており、またVirology 293,103-117(2002)に開示されたヒトパピローマウイルス結合因子(Papillomavirus binding factor：PBF)のアミノ配列である。

#### 【0012】

本発明のタンパク質としては、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号：2に記載のアミノ酸配列を含有するタンパク質、または配列番号：2に記載のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質が挙げられる。ここで配列番号：2に記載のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：2に記載のアミノ酸配列のN末端側及び／又はC末端側に他のアミノ酸配列の付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質などが挙げられる。

また、ここで配列番号：2に記載のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：2に記載のアミノ酸配列と約40%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列が挙げられる。具体的には、配列番号：2に記載のアミノ酸配列の部分配列などが挙げられる。

#### 【0013】

また配列番号：2に記載のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列の別の態様としては、配列番号：2に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列が挙げられる。ここでタンパク質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、後述する本発明タンパク質の活性（CTL誘導活性）が保持される限り制限はない。このように活性を喪失することなくアミノ酸残基が、どのように、何個欠失、置換及び／又は付加されれば

よいかを決定する指標は、当業者に周知のコンピュータプログラム、例えばDNA Star softwareを用いて見出すことができる。例えば変異数は、典型的には、全アミノ酸の10%以内であり、好ましくは全アミノ酸の5%以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の1%以内である。また置換されるアミノ酸は、タンパク質の構造保持の観点から、残基の極性、電荷、可溶性、疎水性、親水性並びに両親媒性など、置換前のアミノ酸と似た性質を有するアミノ酸であることが好ましい。例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe及びTrpは互いに非極性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn及びGlnは互いに非荷電性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、Asp及びGluは互いに酸性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、またLys、Arg及びHisは互いに塩基性アミノ酸に分類されるアミノ酸である。ゆえに、これらを指標として同群に属するアミノ酸を適宜選択することができる。

#### 【0014】

配列番号：2に記載のアミノ酸配列を含有するタンパク質、若しくは配列番号：2に記載のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する本発明のタンパク質としては、配列番号：2に記載のアミノ酸配列を含有するか、若しくは配列番号：2に記載のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、かつ配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質が好ましい。ここで実質的に同質の活性とは、本発明のタンパク質を発現させた細胞がCTLにより認識される、すなわち当該細胞がCTLに反応性を示す、換言すれば本発明のタンパク質若しくは該タンパク質に由来するペプチドがCTLを活性化する若しくはCTLを誘導するという性質を示す。

前記において細胞とは、HLA抗原を発現する細胞であることが好ましい。従って前記実質的に同質の活性とは、より具体的には、例えばHLA-A24やHLA-B55等のHLA抗原を発現する細胞において本発明のタンパク質を発現させることにより、当該細胞がCTLに認識される、すなわちCTLが活性化される（CTLが誘導される）という性質を指す。

#### 【0015】

このような本発明タンパク質の性質は、自体公知の方法あるいはそれに準じる



方法（例えば<sup>51</sup>Crリリースアッセイ（J. Immunol., 159:4753, 1997）、LDHリリースアッセイ（LDH Cytotoxicity Detection Kit（タカラバイオ）、サイトカイン量の測定等）により容易に測定することができる。以下に具体的なアッセイ法を例示する。

#### 【0016】

まず、293-EBNA細胞（Invitrogen社）等の宿主細胞に対し、本発明タンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターと、HLA抗原をコードするDNAを含有する発現ベクターとをトランスフェクトする。ここで用いるHLA抗原をコードするDNAとしては、例えばHLA-A24抗原をコードするDNA若しくはHLA-B55抗原をコードするDNAが挙げられる。HLA-A24抗原をコードするDNAとしてはHLA-A2402のcDNA（Cancer Res., 55: 4248-4252（1995）、Genbank Accession No.M64740）が挙げられる。またHLA-B55抗原をコードするDNAとしてはHLA-B5502のcDNA（GenBank Acc.No.M77777、J. Immunol., 148(4), 1155-1162(1992)）が挙げられる。

#### 【0017】

前記トランスフェクトは、例えばリポフェクトアミン試薬（GIBCO BRL社製）を用いたりリポフェクチン法などにより行うことができる。その後、用いたHLA抗原に拘束性のCTLを加えて作用させ、該CTLが反応（活性化）して産生する種々のサイトカイン、例えばIFN- $\gamma$ の量を、例えばELISA法などで測定することにより調べることができる。ここでCTLとしては、ヒトの末梢血リンパ球を配列番号：2に記載の本発明タンパク質で刺激することにより調製されたCTLや、Int. J. Cancer, 39, 390-396, 1987, N. Eng. J. Med, 333, 1038-1044, 1995等に記載の方法により樹立したCTLを用いることができる。

また本発明のタンパク質は、例えばヒトモデル動物を用いたアッセイ（WO 02/47474 号公報、Int J. Cancer:100,565-570（2002））に供することにより、in vivoでの活性を調べることができる。

#### 【0018】

本発明のタンパク質は、天然物（例えば骨肉種細胞株）から自体公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、また後述する本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有する核酸を含有する形質転換体を培養

することによっても製造することができる。

#### 【0019】

##### 2) 本発明のペプチド

本発明のCTLの誘導剤に含有されるペプチド（以下、本発明のペプチドと称する場合がある）とは、前記本発明のタンパク質の部分ペプチドであって、かつHLA抗原と結合してCTLにより認識される腫瘍抗原ペプチドである。すなわち、前記した本発明のタンパク質のアミノ酸配列の一部よりなるペプチドであって、かつ、該ペプチドとHLA抗原との結合複合体がCTLにより認識されるようなペプチドであれば、本発明のタンパク質のアミノ酸配列中の如何なる位置に存する如何なる長さのペプチドであっても良い。

このような本発明のペプチドは、本発明のタンパク質の一部よりなる候補ペプチドを合成し、該候補ペプチドとHLA抗原との複合体がCTLにより認識されるか否か、すなわち候補ペプチドが腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有するか否かをアッセイすることにより、同定することができる。

#### 【0020】

ここで、ペプチドの合成については、通常のペプチド化学において用いられる方法に準じて行うことができる。該公知方法としては文献（ペプタイド・シンセシス（Peptide Synthesis），Interscience, New York, 1966；ザ・プロテインズ（The Proteins），Vol 2, Academic Press Inc., New York, 1976；ペプチド合成，丸善（株），1975；ペプチド合成の基礎と実験，丸善（株），1985；医薬品の開発 続 第14巻・ペプチド合成，広川書店，1991）などに記載されている方法が挙げられる。

#### 【0021】

次に、本発明の腫瘍抗原ペプチドの同定方法につき、以下に記述する。

HLA-A1, -A0201, -A0204, -A0205, -A0206, -A0207, -A11, -A24, -A31, -A6801, -B7, -B8, -B2705, -B37, -Cw0401, -Cw0602などのHLAの型については、該HLAに結合して提示される抗原ペプチドの配列の規則性（モチーフ）が判明している（例えばImmunogenetics, 41:p178, 1995などを参照のこと）。例えばHLA-A24のモチーフとしては、8～11アミノ酸よりなるペプチドのうちの第2位のア

ミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンまたはトリプトファンであり、C末端のアミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンとなることが知られている (J. Immunol., 152, p3913, 1994、Immunogenetics, 41: p178, 1995、J. Immunol., 155: p4307, 1994)。またHLA-A2のモチーフについては、以下の表1に示したモチーフが知られている (Immunogenetics, 41, p178, 1995、J. Immunol., 155: p4749, 1995)。

## 【0022】

【表1】

| HLA-A2のタイプ | N末端から2番目のアミノ酸 | C末端のアミノ酸 |
|------------|---------------|----------|
| HLA-A0201  | L, M          | V, L     |
| HLA-A0204  | L             | L        |
| HLA-A0205  | V, L, I, M    | L        |
| HLA-A0206  | V, Q          | V, L     |
| HLA-A0207  | L             | L        |

(ペプチドの長さは8～11アミノ酸)

## 【0023】

さらに近年、HLA抗原に結合可能と予想されるペプチド配列を、インターネット上、NIHのBIMASのソフトを使用することにより検索することができる ([http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/))。

ペプチドの長さとしては、各種HLA分子に結合している抗原ペプチドの解析により (Immunogenetics, 41:178, 1995)、通常8から14アミノ酸程度であることが明らかにされている (ただしHLA-DR、-DP、-DQについては、14アミノ酸以上の長さの抗原ペプチドも認められる)。

## 【0024】

これらのモチーフに関わるペプチド部分を本発明のタンパク質のアミノ酸配列中から選び出すのは容易である。例えば、前記BIMASソフトでの検索により、HLA抗原に結合可能と予想される配列を容易に選び出すことができる。選び出された候補ペプチドを前述の方法にて合成し、該候補ペプチドとHLA抗原との複合体がCTLにより認識されるか否か、すなわち候補ペプチドが腫瘍抗原ペプチ

ドとしての活性を有するか否かを測定することにより、本発明のペプチドを同定することができる。

#### 【0025】

本発明の腫瘍抗原ペプチドの具体的な同定法としては、例えば J. Immunol., 154, p2257, 1995 に記載の方法が挙げられる。すなわち、候補ペプチドを提示すると考えられるタイプの HLA 抗原が陽性のヒトから末梢血リンパ球を単離し、in vitro で該候補ペプチドを添加して刺激した場合に、該候補ペプチドをパルスした HLA 抗原陽性細胞を特異的に認識する CTL が誘導された場合は、該候補ペプチドが腫瘍抗原ペプチドに成り得ることが示される。ここで CTL の誘導の有無は、例えば、抗原ペプチド提示細胞に反応して CTL が産生する種々のサイトカイン（例えば IFN- $\gamma$ ）の量を、例えば ELISA 法などによって測定することにより、調べることができる。また  $^{51}\text{Cr}$  で標識した抗原ペプチド提示細胞に対する CTL の傷害性を測定する方法（ $^{51}\text{Cr}$  リリースアッセイ、Int. J. Cancer, 58: p317, 1994）によっても調べることができる。

#### 【0026】

さらに、候補ペプチドを提示すると考えられるタイプの HLA 抗原の cDNA を発現する発現プラスミドを、例えば 293-EBNA 細胞（Invitrogen 社）に導入した細胞に対して候補ペプチドをパルスし、この細胞に対して、前記候補ペプチドを提示すると考えられるタイプの HLA 抗原に拘束性の CTL を反応させ、該 CTL が産生する種々のサイトカイン（例えば IFN- $\gamma$ ）の量を測定することによっても、調べることができる（J. Exp. Med., 187: 277, 1998）。

#### 【0027】

ここで HLA 抗原としては、HLA-A24 抗原若しくは HLA-B55 抗原が挙げられる。HLA-A24 拘束性の腫瘍抗原ペプチドを選択する場合には、前記 HLA 抗原をコードする cDNA としては HLA-A2402 の cDNA（Cancer Res., 55: 4248-4252 (1995)、Genbank Accession No. M64740）を用いることができる。また HLA-B55 拘束性の腫瘍抗原ペプチドを選択する場合は、前記 HLA 抗原をコードする cDNA としては HLA-B5502 遺伝子（GenBank Acc. No. M77777、J. Immunol., 148(4), 1155-1162 (1992)）を用いることができる。

また前記CTLとしては、ヒトの末梢血リンパ球のペプチド刺激により調製される場合の他、Int. J. Cancer, 39, 390-396, 1987, N. Eng. J. Med, 333, 1038-1044, 1995等に記載の方法により樹立したCTLを用いることができる。

#### 【0028】

また本発明のペプチドは、例えばヒトモデル動物を用いたアッセイ (WO 02/47474 号公報、Int J. Cancer:100,565-570 (2002)) に供することにより、in vivoでの活性を調べることができる。

#### 【0029】

前記のように腫瘍抗原ペプチドの配列の規則性 (モチーフ) が判明している場合と異なり、例えばHLA-B55のようにそのペプチドのモチーフが明らかでない場合は、該HLA-B55と腫瘍抗原ペプチドとの複合体を認識するCTL株が存在する場合には、例えばW097/46676に記載の方法に準じて本発明の腫瘍抗原ペプチドを同定することができる。

#### 【0030】

以上のような本発明のペプチドとして、具体的には、配列番号: 2に記載のアミノ酸配列からなる本発明タンパク質の部分ペプチドであって、かつHLA抗原と結合してCTLにより認識されるペプチドが挙げられる。また、本発明のペプチドが結合するHLA抗原の観点からは、HLA-A24抗原またはHLA-B55抗原に結合する本発明のペプチドを挙げることができる。

例えば、配列番号: 2に記載のアミノ酸配列において、BIMASソフトを用いた検索により同定される推定上のHLA-A24結合配列としては、以下の表2に記載の配列が挙げられる。

#### 【0031】

【表 2】

| 位置      | アミノ酸配列                              | 配列番号     |
|---------|-------------------------------------|----------|
| 145-153 | Ala Tyr Arg Pro Val Ser Arg Asn Ile | 配列番号: 6  |
| 320-328 | Asp Phe Tyr Tyr Thr Glu Val Gln Leu | 配列番号: 7  |
| 254-262 | Gly Phe Glu Thr Asp Pro Asp Pro Phe | 配列番号: 8  |
| 240-248 | Lys Tyr Leu Gly Asp Ala Phe Gly Ser | 配列番号: 9  |
| 12-20   | Arg Ser Leu Leu Gly Ala Arg Val Leu | 配列番号: 10 |
| 30-38   | Ala Ala Pro Pro Ser Glu Pro Leu Leu | 配列番号: 11 |
| 424-432 | Ile Tyr Thr Ser Val Ser Trp Ala Ala | 配列番号: 12 |
| 105-113 | Thr Val Trp Leu Leu Glu Gln Lys Leu | 配列番号: 13 |
| 234-242 | His Pro Gln Ala Ser Pro Lys Tyr Leu | 配列番号: 14 |
| 440-448 | Leu Ser Pro Val Arg Ser Arg Ser Leu | 配列番号: 15 |
| 279-288 | Met Tyr Lys Cys Leu Trp Pro Asn Cys | 配列番号: 16 |
| 283-291 | Leu Trp Pro Asn Cys Gly Lys Val Leu | 配列番号: 17 |
| 54-62   | Cys Gln Glu Gln Pro Lys Glu Val Leu | 配列番号: 18 |
| 432-440 | Ala Ala Pro Ser Ala Ala Cys Ser Leu | 配列番号: 19 |
| 101-109 | Glu Gly Gln Val Thr Val Trp Leu Leu | 配列番号: 20 |
| 169-177 | Met Ala Ala Met Val Leu Thr Ser Leu | 配列番号: 21 |
| 129-137 | Gly Pro Cys Pro Gln Ala Pro Pro Leu | 配列番号: 22 |
| 354-362 | Ala Pro Thr Pro Ser Met Thr Gly Leu | 配列番号: 23 |
| 503-511 | Arg Trp Lys Lys Ala Cys Gln Arg Phe | 配列番号: 24 |
| 29-37   | Ser Ala Ala Pro Pro Ser Glu Pro Leu | 配列番号: 25 |

## 【0032】

これらの配列を有するペプチドを、前記本発明ペプチドのアッセイ法に供することにより、本発明のペプチドを同定することができる。

## 【0033】

本発明のペプチドは、本発明のタンパク質のアミノ酸配列の一部からなるペプチド、より具体的には配列番号: 2 に記載のアミノ酸配列の一部からなるペプチドのみならず、そのアミノ酸配列の一部を改変（欠失、置換及び/又は付加）したペプチド（以下、当該改変に係るペプチドを「改変ペプチド」と称する場合がある）であっても、HLA抗原と結合してCTLにより認識されるという性質を有する限り、本発明のペプチドの範疇に含まれる。すなわち、本発明タンパク質のアミ

ノ酸配列、より具体的には配列番号：2に記載のアミノ酸配列の一部からなる本発明のペプチドのアミノ酸配列に対して、1又はそれ以上のアミノ酸残基の改変を施した改変ペプチドであって、かつHLA抗原と結合してCTLにより認識されるという腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有するものは、本発明のペプチドの範疇に含まれる。

#### 【0034】

ここで、アミノ酸残基の「改変」とは、アミノ酸残基の置換、欠失、及び／又は付加（ペプチドのN末端、C末端へのアミノ酸の付加も含む）を意味し、好ましくはアミノ酸残基の置換が挙げられる。アミノ酸残基の置換に係る改変の場合、置換されるアミノ酸残基の数および位置は、腫瘍抗原ペプチドとしての活性が維持される限り、任意であるが、前記したように通常、腫瘍抗原ペプチドの長さが8～14アミノ酸程度であることから、1個から数個の範囲が好ましい。

本発明の改変ペプチドの長さとしては、8～14アミノ酸程度が好ましい（ただしHLA-DR、-DP、-DQについては、14アミノ酸以上の長さの場合もある。）

#### 【0035】

先に記載したように、HLA-A1, -A0201, -A0204, -A0205, -A0206, -A0207, -A11, -A24, -A31, -A6801, -B7, -B8, -B2705, -B37, -Cw0401, -Cw0602などのHLAの型については、該HLAに結合して提示される抗原ペプチドの配列の規則性（モチーフ）が判明している。また前記したように、HLA抗原に結合可能と予想されるペプチド配列をインターネット上検索することができる（[http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/)）。従って、該モチーフ等に基づき、前記改変ペプチドを作製することが可能である。

#### 【0036】

例えばHLA-A24に結合して提示される抗原ペプチドのモチーフとしては、前記したように、8～11アミノ酸よりなるペプチドのうちの第2位のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンまたはトリプトファンであり、C末端のアミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンであることが知られている（J. Immunol., 152:p3913, 1994、Immunogenetics, 41:p178, 1995、J. Immunol., 155:p4307, 1994）。またHLA-A2の場合は、前記

の表1に記載のモチーフが知られている。またインターネット上でHLA抗原に結合可能と予想されるペプチド配列が示されており ([http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/))、例えば前記モチーフ上とり得るアミノ酸に類似の性質を持つアミノ酸が許容される。従って、これらモチーフ上アミノ酸の置換が可能な位置 (HLA-A24、HLA-A2においてはペプチドの第2位とC末端) にあるアミノ酸を他のアミノ酸 (好ましくは前記インターネット上で結合可能と予想されているアミノ酸) に置換したアミノ酸配列を含むものであって、かつHLA抗原と結合してCTLにより認識されるという活性を持つ改変ペプチドを挙げることができる。

#### 【0037】

より好ましくは、該位置において、前記モチーフ上知られたアミノ酸残基のいずれかに置換したアミノ酸配列を含有するペプチドであって、かつ前記活性を有する改変ペプチドが挙げられる。すなわち配列番号: 6~25に示されるようなHLA-A24拘束性のペプチドの場合、その第2位のアミノ酸をチロシン、フェニルアラニン、メチオニンまたはトリプトファンのいずれかに置換し、及び/又はC末端のアミノ酸をフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンに置換した改変ペプチドであって、かつ前記活性を有する改変ペプチドが挙げられる。

#### 【0038】

本発明のペプチドには、さらに、前記本発明のペプチドを含有するペプチドも含まれる。

近年、複数のCTLエピトープ (抗原ペプチド) を連結したペプチド (エピトープペプチド) が、効率的にCTL誘導活性を有することが示されている。例えばJournal of Immunology 1998, 161: 3186-3194には、癌抗原タンパク質PSA由来のHLA-A2, -A3, -A11, B53拘束性CTLエピトープを連結した約30merのペプチドが、イン・ビボでそれぞれのCTLエピトープに特異的なCTLを誘導したことが記載されている。

#### 【0039】

またCTLエピトープとヘルパーエピトープとを連結させたペプチド (エピトープペプチド) により、効率的にCTLが誘導されることも示されている。ここでへ



ヘルパーエпитープとはCD4陽性T細胞を活性化させる作用を有するペプチドを指すものであり (Immunity., 1:751, 1994)、例えばB型肝炎ウイルス由来のHBVc128-140や破傷風毒素由来のTT947-967などが知られている。当該ヘルパーエпитープにより活性化されたCD4陽性T細胞は、CTLの分化の誘導や維持、およびマクロファージなどのエフェクター活性化などの作用を発揮するため、抗腫瘍免疫応答に重要であると考えられている。このようなヘルパーエпитープとCTLエпитープとを連列したペプチドの具体例として、例えばJournal of Immunology 1999, 162: 3915-3925には、HBV由来HLA-A2拘束性抗原ペプチド6種類、HLA-A11拘束性抗原ペプチド3種類、およびヘルパーエпитープより構成されるペプチドをコードするDNA (ミニジーン) が、イン・ビボでそれぞれのエпитープに対するCTLを効果的に誘導したことが記載されている。また実際に、CTLエпитープ (メラノーマ抗原gp100の第280位~288位からなる癌抗原ペプチド) とヘルパーエпитープ (破傷風毒素由来Tヘルパーエпитープ) とを連結したペプチドが臨床試験に供されている (Clinical Cancer Res., 2001, 7:3012-3024)。

#### 【0040】

従って、前記本発明のペプチドを含む複数のエпитープを連結したペプチド (エпитープペプチド) であって、CTL誘導活性を有するペプチドも、本発明のペプチドの具体例として例示することができる。

ここで、本発明のペプチドに連結させるエпитープがCTLエпитープの場合、用いるCTLエпитープとしては、配列番号：2に記載のアミノ酸配列由来のHLA-A1, -A0201, -A0204, -A0205, -A0206, -A0207, -A11, -A24, -A31, -A6801, -B7, -B8, -B2705, -B37, -B55, -Cw0401, -Cw0602などに拘束性のCTLエпитープが挙げられる。また、他の腫瘍抗原タンパク質由来のCTLエпитープも挙げられる。これらCTLエпитープは複数個連結することが可能であり、1つのCTLエпитープの長さとしては、各種HLA分子に結合している抗原ペプチドの解析により (Immunogenetics, 41:178, 1995)、8~14アミノ酸程度を挙げることができる。

#### 【0041】

また本発明のペプチドに連結させるエпитープがヘルパーエпитープの場合、

用いるヘルパーエпитープとしては、前述のようなB型肝炎ウイルス由来のHBVc128-140や破傷風毒素由来のTT947-967などが挙げられる。また当該ヘルパーエпитープの長さとしては、13~30アミノ酸程度、好ましくは13~17アミノ酸程度を挙げることができる。

#### 【0042】

このような複数のエピトープを連結させたペプチド（エピトープペプチド）は、前述のように一般的なペプチド合成法によって製造することができる。またこれら複数のエピトープを連結させたエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドの配列情報に基づいて、通常のDNA合成および遺伝子工学的手法を用いて製造することもできる。すなわち、当該ポリヌクレオチドを周知の発現ベクターに挿入し、得られた組換え発現ベクターで宿主細胞を形質転換して作製された形質転換体を培養し、培養物より目的の複数のエピトープを連結させたエピトープペプチドを回収することにより製造することができる。これらの手法は、前述のように文献(Molecular Cloning, T.Maniatis et al., CSH Laboratory(1983)、DNA Cloning, DM.Glover, IRL PRESS(1985))に記載の方法などに準じて行うことができる。

#### 【0043】

以上のようにして製造された複数のエピトープを連結させたエピトープペプチドを、前述のin vitroアッセイや、WO 02/47474 号公報および Int J. Cancer:100,565-570 (2002)に記述のヒトモデル動物を用いたin vivoアッセイに供すること等によりCTL誘導活性を測定することができる。

#### 【0044】

さらに、本発明のペプチドのN末端アミノ酸のアミノ基、またはC末端アミノ酸のカルボキシル基を修飾することも可能である。

ここでN末端アミノ酸のアミノ基の修飾基としては、例えば1~3個の炭素数1から6のアルキル基、フェニル基、シクロアルキル基、アシル基が挙げられ、アシル基の具体例としては炭素数1から6のアルカノイル基、フェニル基で置換された炭素数1から6のアルカノイル基、炭素数5から7のシクロアルキル基で置換されたカルボニル基、炭素数1から6のアルキルスルホニル基、フェニルス

ルホニル基、炭素数2から6のアルコキシカルボニル基、フェニル基で置換されたアルコキシカルボニル基、炭素数5から7のシクロアルコキシで置換されたカルボニル基、フェノキシカルボニル基等が挙げられる。

C末端アミノ酸のカルボキシル基を修飾したペプチドとしては、例えばエステル体およびアミド体が挙げられ、エステル体の具体例としては、炭素数1から6のアルキルエステル、フェニル基で置換された炭素数0から6のアルキルエステル、炭素数5から7のシクロアルキルエステル等が挙げられ、アミド体の具体例としては、アミド、炭素数1から6のアルキル基の1つまたは2つで置換されたアミド、フェニル基で置換された炭素数0から6のアルキル基の1つまたは2つで置換されたアミド、アミド基の窒素原子を含んで5から7員環のアザシクロアルカンを形成するアミド等が挙げられる。

#### 【0045】

### 3) 本発明のポリヌクレオチド及びそれを含有する核酸

本発明のCTLの誘導剤に含有される核酸（以下、本発明の核酸と称する場合がある）は、前記本発明のタンパク質をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチド（以下、本発明のポリヌクレオチドと称する場合がある）を含有する。

本発明のポリヌクレオチドは、種々の細胞や組織、例えば骨肉種細胞や組織由来のcDNAやmRNA、cRNA、ゲノムDNA、または合成DNAのいずれであっても良い。具体的には、

- (a) 配列番号：1に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド、
  - (b) 配列番号：1に記載の塩基配列を含有するポリヌクレオチド、
  - (c) 配列番号：1に記載の塩基配列の第337位～第1878位を含有するポリヌクレオチド、
  - (d) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、
  - (e) 配列番号：3に記載の塩基配列を含有するポリヌクレオチド、
- またはこれら (a) ～(e) のポリヌクレオチドと実質的に同一の塩基配列を含有するポリヌクレオチドが挙げられる。

#### 【0046】

ここで配列番号：1に記載の塩基配列は、GenBank データベースにおいて Acc

ession No. AF263928として登録されており、またVirology 293,103-117(2002)に開示されたヒトパピローマウイルス結合因子(Papillomavirus binding factor: PBF、配列番号: 2)をコードする塩基配列であり、その第337位～第1878位がオープンリーディングフレームに該当する。また配列番号: 3に記載の塩基配列を含有するポリヌクレオチドは、配列番号: 1に記載の塩基配列と同一の塩基配列部分を含有する類似のポリヌクレオチドである。具体的には、配列番号: 3に記載の塩基配列の第1位～第1469位の部分と、配列番号: 1に記載の塩基配列の第704位～1878位の部分とは、配列番号: 3に存在するイントロン配列の294bpを除けば100%の配列同一性を有している。

#### 【0047】

また、ここで(b)配列番号: 1に記載の塩基配列を含有するポリヌクレオチド、(c)配列番号: 1に記載の塩基配列の第337位～第1878位を含有するポリヌクレオチド、若しくは(e)配列番号: 3に記載の塩基配列を含有するポリヌクレオチドとは、これら配列番号: 1、配列番号: 1の第337位～第1878位、若しくは配列番号: 3のいずれかに記載の塩基配列の5'末端側及び/又は3'末端側に他の塩基配列の付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドが挙げられる。当該ポリヌクレオチドは、当該ポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質が、配列番号: 2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質であることが好ましい。ここで実質的に同質の活性とは、本発明のポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質を発現させた細胞がCTLにより認識されるという性質を指す。当該活性およびその測定法については、前記「1)本発明のタンパク質」において記載したとおりである。

#### 【0048】

これら配列番号: 1または配列番号: 3に記載の塩基配列を含有するポリヌクレオチドは、GenBank Accession No. AF263928において開示されている塩基配列、あるいは本明細書の配列表の配列番号: 1または3に開示されている塩基配列の適当な部分をハイブリダイゼーションのプロープあるいはPCRのプライマーに用いて、例えば骨肉腫細胞株(例えばSaOS-2)由来のcDNAライブラリーをスクリーニングすることなどによりクローニングすることができる。該クローニングは、例え

ばMolecular Cloning 2nd Edt. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等の基本書に従い、当業者ならば容易に行うことができる。

【0049】

また前記(a)～(e)のいずれかのポリヌクレオチドと実質的に同一の塩基配列を含有するポリヌクレチドとは、具体的には、

(f) 前記(a)～(e)のいずれかのポリヌクレチドの相補鎖に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、

(g) 前記(a)～(e)のいずれかのポリヌクレオチドとの配列同一性を示す塩基配列を含有するポリヌクレオチド、

(h) 前記(a)～(e)のいずれかのポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド、  
などが挙げられる。

【0050】

ここで前記(a)～(e)のいずれかのポリヌクレチドの相補鎖に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドとは、例えば前記(a)～(e)のいずれかのポリヌクレオチドの塩基配列と約40%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の配列同一性を有する塩基配列を含有するポリヌクレオチドが挙げられる。具体的には、前記(a)～(e)のいずれかのポリヌクレチドの部分配列などが挙げられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えばMolecular Cloning 2nd Edt. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等の基本書に記載の方法に従って行うことができる。また市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

「ストリンジェントな条件」とは、例えば、 $6\times\text{SSC}$  ( $20\times\text{SSC}$ は、 $33\text{mM Sodium citrate}$ 、 $333\text{mM NaCl}$ を示す)、 $0.5\%$  SDSおよび $50\%$ ホルムアミドを含む溶液中で $42^{\circ}\text{C}$ にてハイブリダイズさせる条件、または $6\times\text{SSC}$ を含む( $50\%$ ホルムアミドは含まない)溶液

中で65℃にてハイブリダイズさせる条件などが挙げられる。またハイブリダイゼーション後の洗浄の条件としては、 $0.1\times SSC$ 、0.5% SDSの溶液中で68℃にて洗浄するような条件が挙げられる。

#### 【0051】

前記(a)～(e)のいずれかのポリヌクレオチドとの配列同一性を示す塩基配列を含有するポリヌクレオチドとは、例えば前記(a)～(e)のいずれかのポリヌクレオチドの塩基配列と約40%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の配列同一性を示す塩基配列を含有するポリヌクレオチドが挙げられる。具体的には、前記(a)～(e)のいずれかのポリヌクレオチドの部分配列などが挙げられる。このような配列同一性を有するポリヌクレオチドは、前述のハイブリダイゼーション反応やPCR反応により、または後述するポリヌクレオチドの改変（欠失、付加、置換）反応により作製することができる。

#### 【0052】

前記(a)～(e)のいずれかのポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドとは、人為的に作製したいわゆる改変タンパク質や、生体内に存在するアレル変異対等のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを意味する。

ここでタンパク質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、本発明のポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質の活性（CTL誘導活性）が保持される限り制限はない。このように活性を喪失することなくアミノ酸残基が、どのように、何個欠失、置換及び／又は付加されればよいかを決定する指標は、当業者に周知のコンピュータプログラム、例えばDNA Star softwareを用いて見出すことができる。例えば変異数は、典型的には、全アミノ酸の10%以内であり、好ましくは全アミノ酸の5%以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の1%以内である。また置換されるアミノ酸は、タンパク質の構造保持の観点から、残基の極性、電荷、可溶性、疎水性、親水性並びに両親媒性など、置換前のアミノ酸と似た性質を有するアミノ酸であることが好ましい。例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Pr

o、Met、Phe及びTrpは互いに非極性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn及びGlnは互いに非荷電性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、Asp及びGluは互いに酸性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、またLys、Arg及びHisは互いに塩基性アミノ酸に分類されるアミノ酸である。ゆえに、これらを指標として同群に属するアミノ酸を適宜選択することができる。

#### 【0053】

この改変タンパク質をコードするポリヌクレチドは、例えば、Molecular Cloning 2nd Edt. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等の基本書に記載の種々の方法、例えば部位特異的変異誘発やPCR法等によって製造することができる。また市販のキットを用いて、Gapped duplex法やKunkel法などの公知の方法に従って製造することもできる。

#### 【0054】

以上のような、前記(a)～(e)のいずれかのポリヌクレオチドと実質的に同一の塩基配列を含有する本発明のポリヌクレチドは、当該ポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質が、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質であることが好ましい。ここで実質的に同質の活性とは、本発明のポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質を発現させた細胞がCTLにより認識されるという性質を指す。当該活性およびその測定法については、前記「1)本発明のタンパク質」において記載したとおりである。

#### 【0055】

本発明のポリヌクレオチドを含有する核酸は、1本鎖および2本鎖のいずれの形態もとることができる。本発明のポリヌクレオチドが2本鎖の場合、前記本発明のポリヌクレオチドを発現ベクターに挿入することにより、本発明のタンパク質を発現するための組換え発現ベクターを作製することができる。すなわち本発明の核酸の範疇には、本発明の2本鎖型ポリヌクレオチドを発現ベクターに挿入して作製された組換え発現ベクターも含まれる。

#### 【0056】

ここで用いる発現ベクターとしては、用いる宿主や目的等に応じて適宜選択す

ることができ、プラスミド、ファージベクター、ウイルスベクター等が挙げられる。

#### 【0057】

例えば、宿主が大腸菌の場合、ベクターとしては、pUC118、pUC119、pBR322、pCR3等のプラスミドベクター、 $\lambda$  ZAPII、 $\lambda$  gt11などのファージベクターが挙げられる。宿主が酵母の場合、ベクターとしては、pYES2、pYEUra3などが挙げられる。宿主が昆虫細胞の場合には、pAcSGHisNT-Aなどが挙げられる。宿主が動物細胞の場合には、pCEP4、pKCR、pCDM8、pGL2、pcDNA3.1、pRc/RSV、pRc/CMVなどのプラスミドベクターや、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクターなどのウイルスベクターが挙げられる。

#### 【0058】

前記ベクターは、発現誘導可能なプロモーター、シグナル配列をコードする遺伝子、選択用マーカー遺伝子、ターミネーターなどの因子を適宜有していても良い。

また、単離精製が容易になるように、チオレドキシン、Hisタグ、あるいはGST（グルタチオンS-トランスフェラーゼ）等との融合タンパク質として発現する配列が付加されていても良い。この場合、宿主細胞内で機能する適切なプロモーター（lac、tac、trc、trp、CMV、SV40初期プロモーターなど）を有するGST融合タンパクベクター（pGEX4Tなど）や、Myc、Hisなどのタグ配列を有するベクター（pcDNA3.1/Myc-Hisなど）、さらにはチオレドキシンおよびHisタグとの融合タンパク質を発現するベクター（pET32a）などを用いることができる。

#### 【0059】

前記で作製された発現ベクターで宿主を形質転換することにより、当該発現ベクターを含有する形質転換細胞を作製することができる。

ここで用いられる宿主としては、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。大腸菌としては、E.coli K-12系統のHB101株、C600株、JM109株、DH5 $\alpha$ 株、AD494(DE3)株などが挙げられる。また酵母としては、サッカロミセス・セルビジエなどが挙げられる。動物細胞としては、L929細胞、BALB/c3T3細胞、C127細胞、CHO細胞、COS細胞、Vero細胞、Hela細胞、293-EBNA細胞などが挙げられ



る。昆虫細胞としてはsf9などが挙げられる。

#### 【0060】

宿主細胞への発現ベクターの導入方法としては、前記宿主細胞に適合した通常の導入方法を用いれば良い。具体的にはリン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法、遺伝子導入用リピッド（Lipofectamine、Lipofectin; Gibco-BRL社）を用いる方法などが挙げられる。導入後、選択マーカーを含む通常の培地にて培養することにより、前記発現ベクターが宿主細胞中に導入された形質転換細胞を選択することができる。

#### 【0061】

以上のようにして得られた形質転換細胞を好適な条件下で培養し続けることにより、本発明のタンパク質を製造することができる。得られたタンパク質は、一般的な生化学的精製手段により、さらに単離・精製することができる。ここで精製手段としては、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等が挙げられる。また本発明のタンパク質を、前述のチオレドキシンやHisタグ、GST等との融合タンパク質として発現させた場合は、これら融合タンパク質やタグの性質を利用した精製法により単離・精製することができる。

#### 【0062】

本発明の核酸の範疇には、さらに、前記本発明のペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレチドを含有する核酸も含まれる。

本発明のペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドは、DNAの形態であってもRNAの形態であっても良い。これら本発明のポリヌクレオチドは、本発明のペプチドのアミノ酸配列情報およびそれによりコードされるDNAの配列情報に基づき容易に製造することができる。具体的には、通常のDNA合成やPCRによる増幅などによって、製造することができる。

#### 【0063】

本発明のペプチドをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドは、具体的には、前記エピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドが挙げられる。

本発明のポリヌクレオチドを含有する核酸は、1本鎖および2本鎖のいずれの

形態もとることができる。本発明のポリヌクレオチドが2本鎖の場合、前記本発明のポリヌクレオチドを発現ベクターに挿入することにより、本発明のペプチド（エピトープペプチド）を発現するための組換え発現ベクターを作製することができる。

ここで用いる発現ベクターや宿主細胞、宿主細胞の形質転換方法等については、前述の記載と同様である。

#### 【0064】

##### 4) 本発明のタンパク質を有効成分とするCTLの誘導剤

本発明のタンパク質を含有する細胞はCTLに認識されるという特徴を有する。すなわち本発明のタンパク質はCTLの誘導剤である。誘導されたCTLは、細胞傷害作用やリンフォカインの産生を介して抗腫瘍作用を発揮することができる。従って本発明のタンパク質は、腫瘍の治療または予防のための医薬の有効成分とすることができる。本発明のタンパク質を有効成分として含有するCTLの誘導剤は、本発明のタンパク質を腫瘍患者に投与することで、腫瘍を治療または予防し得るものである。当該タンパク質を腫瘍患者に投与すると、抗原提示細胞内に取り込まれ、その後、細胞内分解を受けて生じた腫瘍抗原ペプチドがHLA抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に提示され、この複合体に特異的なCTLが体内で効率的に増殖し、腫瘍細胞を破壊する。以上のようにして、腫瘍の治療又は予防が達成される。

#### 【0065】

本発明のタンパク質を有効成分とするCTLの誘導剤は、配列番号：2に記載のPB F陽性の如何なる腫瘍患者に対しても使用することができる。具体的には、例えば骨肉腫などの肉腫全般の予防または治療のために使用することができる。

#### 【0066】

本発明のタンパク質を有効成分として含有するCTLの誘導剤は、細胞性免疫が効果的に成立するように、医薬として許容されるキャリアー、例えば適当なアジュバントと混合して投与、又は併用して投与することができる。

アジュバントとしては、文献 (Clin. Microbiol. Rev., 7:277-289, 1994) に記載のものなどが応用可能であり、具体的には、菌体由来成分又はその誘導体、サ

イトカイン、植物由来成分又はその誘導体、海洋生物由来成分又はその誘導体、水酸化アルミニウムの如き鉱物ゲル、リソレシチン、プルロニックポリオールの如き界面活性剤、ポリアニオン、ペプチド、または油乳濁液（エマルション製剤）などを挙げるができる。また、リボソーム製剤、直径数 $\mu\text{m}$ のビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤、マイクロスフェア製剤、マイクロカプセル製剤なども考えられる。

#### 【0067】

前記において菌体由来成分又はその誘導体とは、具体的には、例えば①細菌の死菌、②細菌由来の細胞壁骨格（Cell Wall Skeleton, CWSと略する）、③菌体由来の特定の成分又はその誘導体等に分類される。ここで①細菌の死菌としては、例えば溶連菌粉末（例えばピシバニール；中外製薬株式会社）、死菌浮遊物カクテル（例えばブロンカスマ・ベルナ；三和化学研究所）、あるいはヒト型結核菌の死菌等が挙げられる。

#### 【0068】

②細菌由来のCWSとしては、マイクバクテリア属由来のCWS（例えばマイコバクテリア属ウシ型結核菌であるBCG株のCWS）、ノカルディア属由来のCWS（例えばノカルディア・ノブラのCWS）、あるいはコリネバクテリア属由来のCWS等が挙げられる。

#### 【0069】

③菌体由来の特定の成分又はその誘導体としては、例えば菌体由来多糖類であるヒト型結核菌由来多糖類成分（例えばアンサー；ゼリア新薬工業株式会社）や担子菌由来多糖類（例えばレンチナン；味の素、クレスチン；三共株式会社、担子菌カワラタケ）、またムラミルジペプチド（MDP）関連化合物、リポ多糖（LPS）、リピドA関連化合物（MPL）、糖脂質トレハロースジマイコレート（TDM）、細菌由来のDNA（例えばCpGオリゴヌクレオチド）、あるいはこれらの誘導体などが挙げられる。

#### 【0070】

これら菌体由来成分及びその誘導体は、既に市販されているものであればそれ入手するか、又は公知文献（例えばCancer Res., 33, 2187-2195(1973)、J.Natl

.Cancer Inst., 48, 831-835(1972)、J.Bacteriol., 94, 1736-1745(1967)、Gann, 69, 619-626(1978)、J.Bacteriol., 92, 869-879(1966)、J.Natl.Cancer Inst., 52, 95-101(1974)) 等に基づき単離又は製造することが可能である。

#### 【0071】

前記において「サイトカイン」とは、例えばIFN- $\alpha$ 、IL-12、GM-CSF、IL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-18、あるいはIL-15などが挙げられる。これらのサイトカインは、天然品であっても遺伝子組換え品であっても良い。これらのサイトカインは、既に市販されていればそれ入手して使用することができる。また遺伝子組換え品であれば、例えばGenBank、EMBL、あるいはDDBJ等のデータベースにおいて登録されている各塩基配列に基づき、常法により所望の遺伝子をクローニングし、適当な発現ベクターに連結して作製された組換え発現ベクターで宿主細胞を形質転換することにより、発現・生産することができる。

#### 【0072】

前記において「植物由来成分又はその誘導体」とは、例えばサポニン由来成分であるQuil A (Accurate Chemical&Scientific Corp)、QS-21 (Aquila Biopharmaceuticals inc.)、あるいはグリチルリチン (SIGMA-ALDRICHなど) などが挙げられる。

#### 【0073】

前記において「海洋生物由来成分又はその誘導体」とは、例えば海綿由来の糖脂質である $\alpha$ -ガラクトシルセラミドなどが挙げられる。

#### 【0074】

前記において油乳濁液 (エマルション製剤) とは、例えば油中水型 (w/o) エマルション製剤、水中油型 (o/w) エマルション製剤、水中油中水型 (w/o/w) エマルション製剤などが挙げられる。

#### 【0075】

ここで油中水型 (w/o) エマルション製剤は、有効成分を水の分散相に分散させた形態をとる。水中油型 (o/w) エマルション製剤は、有効成分を水の分散媒に分散させた形態をとる。また水中油中水型 (w/o/w) エマルション製剤は、有効成分を最内相の水の分散相に分散させた形態をとる。このようなエマ

ルション製剤の調製は、例えば、特開平8-985号公報、特開平9-122476号公報等を参考にして行うことができる。

#### 【0076】

前記においてリポソーム製剤とは、有効成分を脂質二重膜構造のリポソームで水相内または膜内に包み込んだ形の微粒子である。リポソームを作るための主要な脂質としては、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン等が挙げられ、これにジセチルホスフェート、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリン等を加えてリポソームに荷電を与えて安定化させる。リポソームの調製方法としては、超音波法、エタノール注入法、エーテル注入法、逆相蒸発法、フレンチプレスエクストラクション法等が挙げられる。

#### 【0077】

前記においてマイクロスフェア製剤は、均質な高分子マトリックスから構成され、該マトリックス中に有効成分が分散された形の微粒子である。マトリックスの材料としては、アルブミン、ゼラチン、キチン、キトサン、デンプン、ポリ乳酸、ポリアルキルシアノアクリレート等の生分解性高分子が挙げられる。マイクロスフェア製剤の調製方法としては公知の方法 (Eur. J. Pharm. Biopharm. 50:129-146, 2000、Dev. Biol. Stand. 92:63-78, 1998、Pharm. Biotechnol. 10:1-43, 1997) 等に従えばよく特に限定されない。

#### 【0078】

前記においてマイクロカプセル製剤は、有効成分を芯物質として被膜物質で覆った形の微粒子である。被膜物質に用いられるコーティング材料としては、カルボキシメチルセルロース、セルロースアセテートフタレート、エチルセルロース、ゼラチン、ゼラチン・アラビアゴム、ニトロセルロース、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース等の膜形成性高分子が挙げられる。マイクロカプセル製剤の調製方法は、コアセルベーション法、界面重合法等が挙げられる。

#### 【0079】

投与方法としては、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与などが挙げられる。製剤中の本発明のタンパク質の投与量は、治療目的の疾患、患者の年齢

、体重等により適宜調整することができるが、通常0.0001mg～1000mg、好ましくは0.001mg～100mg、より好ましくは0.01mg～10mgであり、これを数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

#### 【0080】

##### 5) 本発明のペプチドを有効成分とするCTLの誘導剤

本発明のペプチドはCTL誘導活性を有するCTLの誘導剤である。誘導されたCTLは、細胞傷害作用やリンフォカインの産生を介して抗腫瘍作用を発揮することができる。従って本発明のペプチドは、腫瘍の治療または予防のための医薬の有効成分とすることができる。本発明のペプチドを有効成分として含有するCTLの誘導剤を腫瘍患者に投与すると、抗原提示細胞のHLA抗原に本発明のペプチドが提示され、提示されたHLA抗原とペプチドとの結合複合体特異的CTLが増殖して腫瘍細胞を破壊することができ、従って、患者の腫瘍を治療又は予防することができる。

本発明のペプチドを有効成分とするCTLの誘導剤は、配列番号：2に記載のPBFタンパク陽性の如何なる腫瘍患者に対しても使用することができる。具体的には、例えば骨肉腫などの肉腫全般の予防または治療のために使用することができる。

#### 【0081】

本発明のペプチドを有効成分とするCTLの誘導剤は、単一のCTLエピトープ（本発明のペプチド）を有効成分とするものであっても、また他のペプチド（CTLエピトープやヘルパーエピトープ）と連結したエピトープペプチドを有効成分とするものであっても良い。近年、複数のCTLエピトープ（抗原ペプチド）を連結したエピトープペプチドが、イン・ビボで効率的にCTL誘導活性を有することが示されている。例えばJournal of Immunology 1998, 161: 3186-3194には、癌抗原タンパク質PSA由来のHLA-A2, -A3, -A11, B53拘束性CTLエピトープ（抗原ペプチド）を連結した約30merのエピトープペプチドが、イン・ビボでそれぞれのCTLエピトープに特異的なCTLを誘導したことが記載されている。またCTLエピトープとヘルパーエピトープとを連結させたエピトープペプチドにより、効率的にCTLが誘導されることも示されている。このようなエピトープペプチドの形態で投与し

た場合、抗原提示細胞内に取り込まれ、その後、細胞内分解を受けて生じた個々の抗原ペプチドがHLA抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に高密度に提示され、この複合体に特異的なCTLが体内で効率的に増殖し、腫瘍細胞を破壊する。このようにして腫瘍の治療または予防が達成される。

#### 【0082】

本発明のペプチドを有効成分とするCTLの誘導剤は、細胞性免疫が効果的に成立するように、医薬として許容されるキャリアー、例えば適当なアジュバントと混合して投与、又は併用して投与することができる。

アジュバントとしては、文献 (Clin. Microbiol.Rev., 7:277-289, 1994)に記載のものなどが応用可能であり、具体的には、菌体由来成分又はその誘導体、サイトカイン、植物由来成分又はその誘導体、海洋生物由来成分又はその誘導体、水酸化アルミニウムの如き鉱物ゲル、リソレシチン、プルロニックポリオールの如き界面活性剤、ポリアニオン、ペプチド、または油乳濁液（エマルション製剤）などを挙げることができる。また、リポソーム製剤、直径数 $\mu\text{m}$ のビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤、マイクロスフェア製剤、マイクロカプセル製剤なども考えられる。これらアジュバントの具体例については、前記「4）本発明のタンパク質を有効成分とするCTLの誘導剤」の項を参照されたい。

#### 【0083】

投与方法としては、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与などが挙げられる。製剤中の本発明のペプチドの投与量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常0.0001mg～1000mg、好ましくは0.001mg～1000mg、より好ましくは0.1mg～10mgであり、これを数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

#### 【0084】

#### 6) 本発明の核酸を有効成分とするCTLの誘導剤

本発明の核酸を発現させた細胞は、CTLに認識されるという特徴を有する。すなわち本発明の核酸はCTLの誘導剤である。誘導されたCTLは、細胞傷害作用やリンフォカインの産生を介して抗腫瘍作用を発揮することができる。従って本発明

の核酸は、腫瘍の治療または予防のための医薬の有効成分とすることができる。  
本発明の核酸を有効成分として含有するCTLの誘導剤は、例えば、本発明の核酸を腫瘍患者に投与し発現させることで、腫瘍を治療または予防し得るものである。

#### 【0085】

例えば発現ベクターに組み込まれた本発明の核酸を以下の方法により腫瘍患者に投与すると、抗原提示細胞内で腫瘍抗原タンパク質が高発現する。その後、細胞内分解を受けて生じた腫瘍抗原ペプチドがHLA抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に高密度に提示されることにより、腫瘍特異的CTLが体内で効率的に増殖し、腫瘍細胞を破壊する。以上のようにして、腫瘍の治療または予防が達成される。

#### 【0086】

本発明の核酸を有効成分とするCTLの誘導剤は、配列番号：1に記載のPBF遺伝子および当該遺伝子の発現産物であるPBF陽性の如何なる腫瘍患者に対しても使用することができる。具体的には、例えば骨肉腫などの肉腫全般の予防または治療のために使用することができる。

本発明の核酸を投与し細胞内に導入する方法としては、ウイルスベクターによる方法およびその他の方法（日経サイエンス，1994年4月号，20-45頁、月刊薬事，36(1)，23-48(1994)、実験医学増刊，12(15)，(1994)、およびこれらの引用文献等）のいずれの方法も適用することができる。

#### 【0087】

ウイルスベクターによる方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンプスウイルス等のDNAウイルス又はRNAウイルスに本発明のDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。この中で、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルス等を用いた方法が特に好ましい。

その他の方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法（DNAワクチン法）、リポソーム法、リポフェクチン法、マイクロインジェクション法



、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特にDNAワクチン法、リポソーム法が好ましい。

#### 【0088】

本発明の核酸を実際に医薬として作用させるには、当該核酸を直接体内に導入する *in vivo*法、およびヒトからある種の細胞を採集し体外で核酸を該細胞に導入しその細胞を体内に戻す *ex vivo*法がある（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48(1994)、実験医学増刊、12(15)、(1994)、およびこれらの引用文献等）。*in vivo*法がより好ましい。

#### 【0089】

*in vivo*法により投与する場合は、治療目的の疾患、症状等に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内等に投与することができる。*in vivo*法により投与する場合は、例えば、液剤等の製剤形態をとりうるが、一般的には有効成分である本発明の核酸を含有する注射剤等とされ、必要に応じて、医薬上許容されるキャリアー（担体）を加えてもよい。また、本発明の核酸を含有するリポソームまたは膜融合リポソーム（センダイウイルス（HVJ）-リポソーム等）においては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤の形態とすることができる。

製剤中の本発明の核酸の含量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常、核酸中のポリヌクレチドの含量として、0.0001mg~100mg、好ましくは0.001mg~10mgの本発明の核酸を、数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

#### 【0090】

また近年、複数のCTLエピトープ（腫瘍抗原ペプチド）を連結したエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチド、あるいはCTLエピトープとヘルパーエピトープとを連結させたエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドが、*in vivo*で効率的にCTL誘導活性を有することが示されている。例えばJournal of Immunology 1999, 162: 3915-3925には、HBV由来HLA-A2拘束性抗原ペプチド6種類、HLA-A11拘束性抗原ペプチド3種類、およびヘルパーエピトープを連結したエピトープペプチドをコードするDNA（ミニジーン）が、イン・ビボでそれぞれ

れのエピトープに対するCTLを効果的に誘導したことが記載されている。

#### 【0091】

従って、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを1種または2種以上連結させることにより、また場合によっては他のペプチドをコードするポリヌクレオチドも連結させることにより作製されたポリヌクレオチドを、適当な発現ベクターに組み込むことにより、CTLの誘導剤の有効成分とすることができる。このようなCTLの誘導剤も、前記と同様の投与方法および投与形態をとることができる。

#### 【0092】

##### 7)本発明の抗原提示細胞

前記した本発明のタンパク質、ペプチドおよび核酸は、腫瘍患者の治療において、以下のようにイン・ビトロで利用することができる。すなわち本発明のタンパク質、ペプチドおよび核酸のいずれかと抗原提示能を有する細胞とをイン・ビトロで接触させることにより、抗原提示細胞を作製することができる。具体的には本発明は、腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞と、本発明のタンパク質、ペプチドおよび核酸のいずれかとをイン・ビトロで接触させることにより、当該細胞の細胞表面にHLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を提示させた抗原提示細胞、およびその製造方法を提供するものである。

#### 【0093】

ここで「抗原提示能を有する細胞」とは、本発明のペプチドを提示することの可能なHLA抗原を細胞表面に発現する細胞であれば特に限定されないが、特に抗原提示能が高いとされる樹状細胞が好ましい。

また、前記抗原提示能を有する細胞から本発明の抗原提示細胞を調製するために添加される物質としては、本発明のタンパク質、ペプチドおよび核酸のいずれであっても良い。

#### 【0094】

本発明の抗原提示細胞は、腫瘍患者から抗原提示能を有する細胞を単離し、該細胞に本発明のタンパク質またはペプチドをイン・ビトロでパルスして、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を提示させることにより得られる(Cancer Im

munol.Immunother.,46:82,1998、J.Immunol.,158,p1796,1997、Cancer Res.,59,p1184,1999)。樹状細胞を用いる場合は、例えば、腫瘍患者の末梢血からフィコール法によりリンパ球を分離し、その後非付着細胞を除き、付着細胞をGM-CSFおよびIL-4存在下で培養して樹状細胞を誘導し、当該樹状細胞を本発明のタンパク質またはペプチドと共に培養してパルスすることなどにより、本発明の抗原提示細胞を調製することができる。

また、前記抗原提示能を有する細胞に本発明の核酸を導入することにより本発明の抗原提示細胞を調製する場合は、当該核酸は、DNAの形態であっても、RNAの形態であっても良い。具体的には、DNAの場合は Cancer Res.,56:p5672,1996や J.Immunol.,161:p5607,1998などを参考にして行うことができ、またRNAの場合は J.Exp.Med.,184:p465,1996などを参考にして行うことができる。

#### 【0095】

前記抗原提示細胞はCTLの誘導剤の有効成分とすることができる。当該抗原提示細胞を有効成分として含有するCTLの誘導剤は、抗原提示細胞を安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げられる。このような抗原提示細胞を有効成分として含有してなるCTLの誘導剤を患者の体内に戻すことにより、本発明のPBF陽性の患者の体内で効率良く特異的なCTLが誘導され、腫瘍を治療することができる。

#### 【0096】

##### 8)本発明のCTL

本発明のタンパク質、ペプチドおよび核酸は、腫瘍患者の治療において、以下のようにイン・ビトロで利用することができる。すなわち本発明のタンパク質、ペプチドおよび核酸のいずれかと末梢血リンパ球とをイン・ビトロで接触させることにより、CTLを誘導することができる。具体的には本発明は、腫瘍患者由来の末梢血リンパ球と、本発明のタンパク質、ペプチドおよび核酸のいずれかとをイン・ビトロで接触させることにより誘導されたCTL、およびその誘導方法を提供するものである。

## 【0097】

例えばメラノーマにおいては、患者本人の腫瘍内浸潤T細胞を体外で大量に培養して、これを患者に戻す養子免疫療法に治療効果が認められている（J.Nat'l.Cancer.Inst.,86:1159、1994）。またマウスのメラノーマにおいては、脾細胞をイン・ビトロで腫瘍抗原ペプチドTRP-2で刺激し、腫瘍抗原ペプチドに特異的なCTLを増殖させ、該CTLをメラノーマ移植マウスに投与することにより、転移抑制が認められている（J.Exp.Med.,185:453,1997）。これは、抗原提示細胞のHLA抗原と腫瘍抗原ペプチドとの複合体を特異的に認識するCTLをイン・ビトロで増殖させた結果に基づくものである。従って、本発明のタンパク質、ペプチドまたは核酸を用いて、イン・ビトロで患者末梢血リンパ球を刺激して腫瘍特異的CTLを増やした後、このCTLを患者に戻す治療法は有用であると考えられる。

## 【0098】

当該CTLは腫瘍の治療剤または予防剤の有効成分とすることができる。該治療剤または予防剤は、CTLを安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げられる。このようなCTLを有効成分として含有してなる腫瘍の治療または予防剤を患者の体内に戻すことにより、本発明のPBF陽性の患者の体内でCTLによる腫瘍細胞の傷害作用が促進され、腫瘍細胞を破壊することにより、腫瘍を治療することができる。

## 【0099】

## 9)腫瘍マーカー

## ①本発明のポリヌクレオチドに関する腫瘍マーカー

本発明においては、配列番号：1に記載のPBF遺伝子が、正常細胞に比して肉腫細胞において特異的に高発現しているという知見を得た。よって、当該遺伝子発現の有無や発現の程度を検出することによって、腫瘍、特に肉腫の有無や程度が特異的に検出でき、該疾患の診断を行うことができる。

## 【0100】

本発明のポリヌクレオチドは、従って、被験者におけるPBF遺伝子の発現の有

無またはその程度を検出することによって、該被験者が腫瘍に罹患しているか否かまたはその罹患の程度を診断することのできるツール（腫瘍マーカー）として有用である。

#### 【0101】

本発明の腫瘍マーカーは、前記本発明ポリヌクレオチドの塩基配列において、連続する少なくとも15塩基を含有するポリヌクレオチド及び／またはそれに相補的なポリヌクレオチドからなることを特徴とするものである。

#### 【0102】

具体的には、本発明の腫瘍マーカーは、配列番号：1または3に記載の塩基配列において、連続する少なくとも15塩基を含有するポリヌクレオチド及び／またはそれに相補的なポリヌクレオチドからなるものを挙げることができる。

#### 【0103】

ここで相補的なポリヌクレオチド（相補鎖、逆鎖）とは、前記配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドの全長配列、または該塩基配列において少なくとも連続した15塩基長の塩基配列を含有するその部分配列（ここでは便宜上、これらを「正鎖」ともいう）に対して、A:TおよびG:Cといった塩基対関係に基づいて、塩基的に相補的な関係にあるポリヌクレオチドを意味するものである。ただし、かかる相補鎖は、対象とする正鎖の塩基配列と完全に相補配列を形成する場合に限らず、対象とする正鎖とストリンジェントな条件でハイブリダイズすることができる程度の相補関係を有するものであってもよい。なお、ここでストリンジェントな条件は、Berger and Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques Methods in Enzymology, Vol. 152, Academic Press, San Diego CA) に教示されるように、複合体或いはプローブを結合する核酸の融解温度( $T_m$ )に基づいて決定することができる。例えばハイブリダイズ後の洗浄条件として、通常「1×SSC、0.1%SDS、37℃」程度の条件を挙げることができる。相補鎖はかかる条件で洗浄しても対象とする正鎖とハイブリダイズ状態を維持するものであることが好ましい。特に制限されないが、より厳しいハイブリダイズ条件として「0.5×SSC、0.1%SDS、42℃」程度、さらに厳しいハイブリダイズ条件として「0.1×SSC、0.1%SDS、65℃」程度の洗浄条件を挙げることができ

る。具体的には、このような相補鎖として、対象の正鎖の塩基配列と完全に相補的な関係にある塩基配列からなる鎖、並びに該鎖と少なくとも90%、好ましくは95%の相同性を有する塩基配列からなる鎖を例示することができる。

#### 【0104】

ここで、正鎖側のポリヌクレオチドには、配列番号：1または3に記載の塩基配列、またはその部分配列を含有するものだけでなく、上記相補鎖の塩基配列に対してさらに相補的な関係にある塩基配列からなる鎖を含めることができる。

#### 【0105】

さらに上記正鎖のポリヌクレオチド及び相補鎖（逆鎖）のポリヌクレオチドは、各々一本鎖の形態で腫瘍マーカーとして使用されても、また二本鎖の形態で腫瘍マーカーとして使用されてもよい。

#### 【0106】

本発明の腫瘍マーカーは、具体的には、前記配列番号：1または3に記載の塩基配列（全長配列）からなるポリヌクレオチドであってもよいし、その相補配列からなるポリヌクレオチドであってもよい。またこれら本発明遺伝子もしくは該遺伝子に由来するポリヌクレオチドを選択的に（特異的に）認識するものであれば、上記全長配列またはその相補配列の部分配列からなるポリヌクレオチドであってもよい。この場合、部分配列としては、上記全長配列またはその相補配列の塩基配列から任意に選択される少なくとも15個の連続した塩基長を含有するポリヌクレオチドを挙げることができる。

#### 【0107】

なお、ここで「選択的に（特異的に）認識する」とは、例えばノーザンブロット法においては、本発明のPBF遺伝子、またはこれらに由来するポリヌクレオチドが特異的に検出できること、またRT-PCR法においては、本発明のPBF遺伝子、またはこれらに由来するポリヌクレオチドが特異的に生成されることを意味するが、それに限定されることなく、当業者が上記検出物または生成物がPBF遺伝子に由来するものであると判断できるものであればよい。

#### 【0108】

本発明の腫瘍マーカーは、例えば配列番号1又は3に記載の塩基配列をもとに

、例えばprimer 3 ( HYPERLINK <http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>) あるいはベクターNTI (Infomax社製) を利用して設計することができる。具体的には前記本発明遺伝子の塩基配列を primer 3またはベクターNTI のソフトウェアにかけて得られる、プライマーまたはプローブの候補配列、若しくは少なくとも該配列の一部を含む配列をプライマーまたはプローブとして使用することができる。このような本発明の腫瘍マーカーの具体例としては、例えば配列番号: 4または5に記載のプライマーを挙げることができる。

#### 【0109】

本発明の腫瘍マーカーは、上述するように連続する少なくとも15塩基の長さを含有するものであればよいが、具体的にはマーカーの用途に応じて、長さを適宜選択し設定することができる。

#### 【0110】

本発明において腫瘍の検出(診断)は、被験者の生体組織、特に腫瘍(肉腫)が疑われる被験組織におけるPBF遺伝子の発現の有無または発現レベル(発現量)を評価することによって行われる。この場合、上記本発明の腫瘍マーカーは、PBF遺伝子の発現によって生じたRNAまたはそれに由来するポリヌクレオチドを特異的に認識し増幅するためのプライマーとして、または該RNAまたはそれに由来するポリヌクレオチドを特異的に検出するためのプローブとして利用することができる。

#### 【0111】

本発明腫瘍マーカーを腫瘍の検出においてプライマーとして用いる場合には、通常15bp~100bp、好ましくは15bp~50bp、より好ましくは15bp~35bpの塩基長を含有するものが例示できる。また検出プローブとして用いる場合には、通常15bp~全配列の塩基数、好ましくは15bp~1kb、より好ましくは100bp~1kbの塩基長を含有するものが例示できる。

#### 【0112】

本発明の腫瘍マーカーは、ノーザンブロット法、RT-PCR法、in situハイブリダーゼーション法などといった、特定遺伝子を特異的に検出する公知の方法において、常法に従ってプライマーまたはプローブとして利用することができる。

## 【0113】

本発明の腫瘍マーカーは、腫瘍（特に肉腫）の診断、検出（罹患の有無や罹患の程度の診断）に有用である。具体的には、該腫瘍マーカーを利用した腫瘍の診断は、被験者における生体組織（腫瘍が疑われる組織）と正常者における同様の組織におけるPBF遺伝子の遺伝子発現レベルの違いを判定することによって行うことができる。この場合、遺伝子発現レベルの違いには、発現のある／なしの違いだけでなく、被験者の組織と正常者の組織の両者ともに発現がある場合でも、両者間の発現量の格差が2倍以上、好ましくは3倍以上の場合が含まれる。具体的にはPBF遺伝子は腫瘍（肉腫）で発現誘導を示すので、被験者の組織で発現しており、該発現量が正常者の対応組織の発現量と比べて2倍以上、好ましくは3倍以上多ければ、被験者について腫瘍の罹患が疑われる。

## 【0114】

## ②本発明の抗体に関する腫瘍マーカー

本発明は腫瘍マーカーとして、本発明のタンパク質又はその部分ペプチドを特異的に認識することのできる抗体（以下、本発明の抗体と称する場合がある）を提供する。より具体的には、本発明は、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる本発明のタンパク質またはその部分ペプチドを特異的に認識する抗体からなる腫瘍マーカーを提供する。

## 【0115】

本発明においては、種々の肉腫由来細胞において、本発明のPBF遺伝子が特異的に高発現しているという知見を得た。よってこれらの遺伝子の発現産物（タンパク質）の有無やその発現の程度を検出することによって、上記腫瘍（肉腫）の有無やその程度が特異的に検出でき、該疾患の診断を行うことができる。

上記抗体は、従って、被験者における上記タンパク質の発現の有無またはその程度を検出することによって、該被験者が腫瘍に罹患しているか否かまたはその疾患の程度を診断することのできるツール（腫瘍マーカー）として有用である。

## 【0116】

本発明の抗体は、その形態に特に制限はなく、本発明タンパク質（具体的には配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるPBFタンパク質）を免疫抗原とするポ



リクローナル抗体であっても、またそのモノクローナル抗体であってもよい。さらにこれら本発明タンパク質のアミノ酸配列のうち少なくとも連続する、通常8アミノ酸、好ましくは15アミノ酸、より好ましくは20アミノ酸からなるポリペプチドに対して抗原結合性を有する抗体も、本発明の抗体に含まれる。

#### 【0117】

これらの抗体の製造方法は、すでに周知であり、本発明の抗体もこれらの常法に従って製造することができる (Current Protocol in Molecular Biology, Chapter 11.12~11.13(2000))。具体的には、本発明の抗体がポリクローナル抗体の場合には、常法に従って大腸菌等で発現し精製した本発明タンパク質を用いて、あるいは常法に従ってこれら本発明タンパク質の部分アミノ酸配列を含有するオリゴペプチドを合成して、家兎等の非ヒト動物に免疫し、該免疫動物の血清から常法に従って得ることが可能である。一方、モノクローナル抗体の場合には、常法に従って大腸菌等で発現し精製した本発明タンパク質、あるいはこれらタンパク質の部分アミノ酸配列を含有するオリゴペプチドをマウス等の非ヒト動物に免疫し、得られた脾臓細胞と骨髓腫細胞とを細胞融合させて調製したハイブリドーマ細胞の中から得ることができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.4~11.11)。

#### 【0118】

抗体の作製に免疫抗原として使用される本発明タンパク質 (具体的には配列番号:2に記載のアミノ酸配列よりなるPBFタンパク質) は、本発明により提供される遺伝子の配列情報 (配列番号1,3) に基づいて、DNAクローニング、各プラスミドの構築、宿主へのトランスフェクション、形質転換体の培養および培養物からのタンパク質の回収の操作により得ることができる。これらの操作は、当業者に既知の方法、あるいは文献記載の方法 (Molecular Cloning, T.Maniatis et al., CSH Laboratory (1983), DNA Cloning, DM. Glover, IRL PRESS (1985)) などに準じて行うことができる。また本発明タンパク質の部分ペプチドは、本発明により提供されるアミノ酸配列の情報 (配列番号:2) に従って、一般的な化学合成法 (ペプチド合成) によって製造することもできる。詳しくは前述の1)~

3)の項を参照されたい。

#### 【0119】

本発明の抗体は、また、本発明タンパク質の部分アミノ酸配列を含有するオリゴペプチドを用いて調製されるものであってよい。かかる抗体の製造のために用いられるオリゴ（ポリ）ペプチドは、機能的な生物活性を有することは要しないが、本発明タンパク質と同様な免疫原特性を有するものであることが望ましい。好ましくはこの免疫原特性を有し、且つ本発明タンパク質のアミノ酸配列において少なくとも連続する8アミノ酸、好ましくは15アミノ酸、より好ましくは20アミノ酸からなるオリゴ（ポリ）ペプチドを例示することができる。

#### 【0120】

かかるオリゴ（ポリ）ペプチドに対する抗体の製造は、宿主に応じて種々のアジュバントを用いて免疫学的反応を高めることによって行うこともできる。限定はされないが、そのようなアジュバントには、フロイントアジュバント、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル、並びにリゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシアニン及びジニトロフェノールのような表面活性物質、BCG（カルメットーゲラン桿菌）やコリネバクテリウム・パルヴムなどのヒトアジュバントが含まれる。

#### 【0121】

本発明の抗体は、PBFタンパクに特異的に結合する性質を有することから、該抗体を利用することによって、被験者の組織内に発現した上記タンパク質を特異的に検出することができる。すなわち、当該抗体は被験者の組織内におけるPBF発現の有無を検出するためのプローブとして有用である。

#### 【0122】

具体的には、腫瘍が疑われる被験組織や血液をバイオプシ等で採取し、そこから常法に従ってタンパク質を調製して、例えばウェスタンブロット法、ELISA法など公知の検出方法において、上記抗体を常法に従ってプローブとして使用することによってPBFを検出することができる。

#### 【0123】

腫瘍の診断に際しては、被験者組織におけるPBFタンパクの量と正常な対応組

織におけるPBFタンパク量の違いを判定すればよい。この場合、タンパク量の違いには、タンパクのある／なし、あるいはタンパク量の違いが2倍以上、好ましくは3倍以上の場合が含まれる。具体的にはPBF遺伝子は腫瘍(肉腫)で発現誘導を示すので、被験者組織で該遺伝子の発現産物(PBF)が存在しており、該量が正常な組織の発現産物量と比べて2倍以上、好ましくは3倍以上多いことが判定されれば、腫瘍の罹患が疑われる。

#### 【0124】

#### ③本発明のタンパク質またはペプチドに関する腫瘍マーカー

本発明は腫瘍マーカーとして、本発明のタンパク質又はその部分ペプチドに対する抗体を特異的に認識することのできるタンパク質またはペプチドを提供する。より具体的には、本発明は、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる本発明のタンパク質またはその部分ペプチドからなる腫瘍マーカーを提供する。

ここで腫瘍マーカーの成分とされる本発明タンパク質の部分ペプチドとしては、本発明タンパク質のアミノ酸配列のうち少なくとも連続する、通常8アミノ酸、好ましくは15アミノ酸、より好ましくは20アミノ酸からなるポリペプチドを挙げることができる。

#### 【0125】

本発明のタンパク質やペプチド(ポリペプチド)を診断薬として用い、腫瘍が疑われる患者から得た試料(例えば血液、腫瘍が疑われる組織など)中の抗体の存在を検出することにより、腫瘍を診断することが可能である。ここで用いる本発明タンパク質およびペプチドの製造法については、前記1)および2)の項で述べたとおりである。

#### 【0126】

具体的には、患者の血液を採取するか、若しくは腫瘍が疑われる被験組織をバイオプシ等で採取し、そこから常法に従ってタンパク質を調製して、例えばウェスタンブロット法、ELISA法など公知の検出方法において、上記本発明タンパク質またはペプチドを常法に従ってプローブとして使用することによって、PBFに対する抗体を検出することができる。

#### 【0127】

腫瘍の診断に際しては、被験者組織における抗PBF抗体の量と正常な対応組織における抗PBF抗体の量の違いを判定すればよい。この場合、タンパク量の違いには、タンパクのある／なし、あるいはタンパク量の違いが2倍以上、好ましくは3倍以上の場合が含まれる。具体的にはPBF遺伝子は腫瘍(肉腫)で発現誘導を示すので、被験者組織で該遺伝子の発現産物(PBF)に対する抗体が存在しており、この抗PBF抗体の量が正常な組織での抗PBF抗体量と比べて2倍以上、好ましくは3倍以上多いことが判定されれば、腫瘍の罹患が疑われる。

#### 【0128】

さらに近年、抗原ペプチドとHLA抗原との複合体を用いて抗原特異的CTLを検出する新しい検出方法が確立された(Science, 274:p94, 1996)。本発明のペプチドとHLA抗原との複合体を当該検出方法に供し、腫瘍抗原特異的CTLを検出することにより、腫瘍を診断することができる。

具体的には、文献(Science, 274:p94, 1996)に記載の方法に従って蛍光標識したHLA抗原と本発明のペプチドとの複合体の4量体を作製し、これを用いて腫瘍が疑われる患者の末梢血リンパ球中の抗原ペプチド特異的CTLをフローサイトメーターにより定量することにより、前記診断を行うことができる。

#### 【0129】

#### ④腫瘍の検出方法(診断方法)

本発明は、前述した本発明腫瘍マーカーを利用した腫瘍の検出方法(診断方法)を提供するものである。

#### 【0130】

具体的には、本発明の検出方法(診断方法)は、被験者の血液を採取するか、若しくは腫瘍が疑われる被験組織の一部をバイオプシ等で採取し、そこに含まれるPBF遺伝子の遺伝子発現レベル、これらの遺伝子に由来するPBFタンパク質の量、当該PBFに対する抗体の量、若しくはPBF由来の腫瘍抗原ペプチドとHLA抗原との複合体を認識するCTLの量を、検出・測定することにより、腫瘍の罹患の有無またはその程度を診断するものである。また本発明の検出(診断)方法は、例えば腫瘍患者において、該腫瘍の改善のために治療薬を投与した場合における、該疾患の改善の有無またはその程度を検出(診断)することもできる。さらに本発

明の検出（診断）方法は、本発明のタンパク質、ペプチドまたは核酸を有効成分とする医薬の適応可能な腫瘍患者の選択や、当該医薬による治療効果の判定などにも利用できる。

#### 【0131】

本発明の検出方法は次の(a)、(b)及び(c)の工程を含むものである：

- (a) 被験者の生体試料と本発明の腫瘍マーカーを接触させる工程、
- (b) 生体試料中のPBF遺伝子発現レベル、PBFタンパク質量、抗PBF抗体量、またはPBF由来の腫瘍抗原ペプチドとHLA抗原との複合体を認識するCTLの量を、上記腫瘍マーカーを指標として測定する工程、
- (c) (b)の結果をもとに、腫瘍の罹患を判断する工程。

#### 【0132】

ここで用いられる生体試料としては、被験者の生体組織（腫瘍が疑われる組織及びその周辺組織、または血液など）から調製される試料を挙げることができる。具体的には、該組織から調製されるRNA含有試料、若しくはそれからさらに調製されるポリヌクレオチドを含む試料、または上記組織から調製されるタンパク質、抗体を含む試料、あるいは上記組織から調製される末梢血リンパ球を含む試料を挙げることができる。

本発明の診断方法は、測定対象として用いる生体試料の種類に応じて、具体的には下記のようにして実施される。

#### 【0133】

(④-1) 測定対象の生体試料としてRNAを利用する場合

測定対象物としてRNAを利用する場合、腫瘍の検出は、具体的に下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む方法によって実施することができる：

- (a) 被験者の生体試料から調製されたRNAまたはそれから転写された相補的ポリヌクレオチドと、前記本発明の腫瘍マーカー（本発明のポリヌクレオチドの塩基配列において連続する少なくとも15塩基を含有するポリヌクレオチド及び/又は該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド）とを結合させる工程、
- (b) 該腫瘍マーカーに結合した生体試料由来のRNAまたは該RNAから転写された相補的ポリヌクレオチドを、上記腫瘍マーカーを指標として測定する工程、

(c)上記(b)の測定結果に基づいて、腫瘍の罹患を判断する工程。

【0134】

測定対象物としてRNAを利用する場合は、本発明の検出方法（診断方法）は、該RNA中のPBF遺伝子の発現レベルを検出し、測定することによって実施される。具体的には、前述のポリヌクレオチドからなる本発明の腫瘍マーカー（本発明のポリヌクレオチドの塩基配列において連続する少なくとも15塩基を含有するポリヌクレオチド及び／又はその相補的なポリヌクレオチド）をプライマーまたはプローブとして用いて、ノーザンブロット法、RT-PCR法、DNAチップ解析法、in situハイブリダイゼーション解析法などの公知の方法を行うことにより実施できる。

【0135】

ノーザンブロット法を利用する場合は、本発明の上記腫瘍マーカーをプローブとして用いることによって、RNA中のPBF遺伝子の発現の有無やその発現レベルを検出、測定することができる。具体的には、本発明の腫瘍マーカー（相補鎖）を放射性同位元素（ $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ など：RI）や蛍光物質などで標識し、それを、常法に従ってナイロンメンブレン等にトランスファーした被験者の生体組織由来のRNAとハイブリダイズさせた後、形成された腫瘍マーカー（DNA）とRNAとの二重鎖を、腫瘍マーカーの標識物（RI若しくは蛍光物質）に由来するシグナルを放射線検出器（BAS-1800II、富士フィルム社製）または蛍光検出器で検出、測定する方法を例示することができる。また、AlkPhos Direct Labelling and Detection System（Amersham Pharmacia Biotech社製）を用いて、該プロトコールに従って腫瘍マーカー（プローブDNA）を標識し、被験者の生体組織由来のRNAとハイブリダイズさせた後、腫瘍マーカーの標識物に由来するシグナルをマルチバイオイメージャーSTORM860（Amersham Pharmacia Biotech社製）で検出、測定する方法を使用することもできる。

【0136】

RT-PCR法を利用する場合は、本発明の上記腫瘍マーカーをプライマーとして用いることによって、RNA中のPBF遺伝子の発現の有無や発現レベルを検出、測定することができる。具体的には、被験者の生体組織由来のRNAから常法に従ってcDN

Aを調製して、これを鋳型として標的のPBF遺伝子の領域が増幅できるように、本発明の腫瘍マーカーから調製した一对のプライマー（上記cDNA（-鎖）に結合する正鎖、+鎖に結合する逆鎖）をこれとハイブリダイズさせて、常法に従ってPCR法を行い、得られた増幅二本鎖DNAを検出する方法を例示することができる。なお、増幅された二本鎖DNAの検出は、上記PCRを予めRIや蛍光物質で標識しておいたプライマーを用いて行うことによって産生される標識二本鎖DNAを検出する方法、産生された二本鎖DNAを常法に従ってナイロンメンブレン等に転写させて、標識した腫瘍マーカーをプローブとして使用してこれとハイブリダイズさせて検出する方法などを用いることができる。なお、生成された標識二本鎖DNA産物はアジレント2100バイオアナライザ（横河アナリティカルシステムズ社製）などで測定することができる。また、SYBR Green R T-PCR Reagents（Applied Biosystems 社製）で該プロトコルに従ってRT-PCR反応液を調製し、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System（Applied Biosystems 社製）で反応させて、該反応物を検出することもできる。

#### 【0137】

DNAチップ解析を利用する場合は、本発明の上記腫瘍マーカーをDNAプローブ（1本鎖または2本鎖）として貼り付けたDNAチップを用意し、これに被験者の生体組織由来のRNAから常法によって調製されたcRNAとハイブリダイズさせて、形成されたDNAとcRNAとの二本鎖を、本発明の腫瘍マーカーから調製される標識プローブと結合させて検出する方法を挙げることができる。

#### 【0138】

④-2) 測定対象の生体試料としてタンパク質を用いる場合

測定対象物としてタンパク質を用いる場合は、本発明の腫瘍の検出方法（診断方法）は、生体試料中のPBFを検出し、その量を測定することによって実施される。具体的には下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む方法によって実施することができる：

- (a)被験者の生体試料から調製されたタンパク質と抗体に関する本発明の腫瘍マーカー（PBFを認識する抗体）とを結合させる工程、
- (b)該腫瘍マーカーに結合した生体試料由来のタンパク質を、上記腫瘍マーカー

を指標として測定する工程、

(c)上記(b)の測定結果に基づいて、腫瘍の罹患を判断する工程。

#### 【0139】

より具体的には、本発明の腫瘍マーカーとして抗体（PBFを認識する抗体）を用いて、ウエスタンブロット法などの公知方法でPBFを検出、定量する方法を挙げることができる。

#### 【0140】

ウエスタンブロット法は、一次抗体として本発明腫瘍マーカーを用いた後、二次抗体として<sup>125</sup>Iなどの放射性同位元素、蛍光物質、ホースラディッシュペルオキシターゼ（HRP）などの酵素等で標識した標識抗体（一次抗体に結合する抗体）を用い、得られる標識化合物の放射性同位元素、蛍光物質などに由来するシグナルを放射線測定器（BAS-1800II：富士フィルム社製など）、蛍光検出器などで検出し、測定することによって実施できる。また、一次抗体として本発明腫瘍マーカーを用いた後、ECL Plus Western Blotting Detection System（アマシャム ファルマシアバイオテック社製）を用いて、該プロトコールに従って検出し、マルチバイオイメジャーSTORM860（アマシャム ファルマシアバイオテック社製）で測定することもできる。

#### 【0141】

(④-3) 測定対象の生体試料として抗体を用いる場合

測定対象物としてタンパク質中に存在する抗体を用いる場合は、本発明の腫瘍の検出方法（診断方法）は、生体試料中の抗PBF抗体を検出し、その量を測定することによって実施される。具体的にはタンパク質またはペプチドに関する本発明の腫瘍マーカーを用い、前記（④-2）と同様の手法にて行うことができる。

#### 【0142】

(④-4) 測定対象の生体試料として腫瘍抗原特異的CTLを用いる場合

測定対象物として末梢血リンパ球中に存在する腫瘍抗原特異的CTLを用いる場合は、本発明の腫瘍の検出方法（診断方法）は、生体試料中のPBF特異的CTLを検出し、その量を測定することによって実施される。具体的には、文献（Science, 274:p94, 1996）に記載の方法に従って蛍光標識したHLA抗原と本発明のペプチド



との複合体の4量体を作製し、これを用いて腫瘍が疑われる患者の末梢血リンパ球中の抗原ペプチド特異的CTLをフローサイトメーターにより定量することにより行うことができる。

#### 【0143】

##### (④-5)腫瘍の診断

腫瘍の診断は、例えば、被験者の血液や腫瘍が疑われる被験組織におけるPBF遺伝子の遺伝子発現レベル、これらの遺伝子の発現産物であるPBFタンパク質の量、抗PBF抗体の量、またはPBF特異的CTLの量を測定することにより行うことができる。その際、場合によっては正常な対応組織における当該遺伝子発現レベルまたは当該タンパク質レベル等と比較し、両者の違いを判定することによって行うことができる。

#### 【0144】

ここで被験者の被験組織と正常な対応組織との遺伝子、タンパク質、抗体、またはCTLの量（レベル）の比較は、被験者の生体試料と正常者の生体試料を対象とした測定を並行して行うことで実施できる。並行して行わない場合は、複数（少なくとも2つ、好ましくは3以上、より好ましくは5以上）の正常な組織を用いて均一な測定条件で測定して得られたPBF遺伝子の遺伝子発現レベル、PBFの量、抗PBF抗体の量、またはPBF特異的CTLの量の平均値または統計的中間値を、正常者の値として、比較に用いることができる。

#### 【0145】

被験者が、腫瘍であるかどうかの判断は、例えば該被験者の組織におけるPBF遺伝子の遺伝子発現レベル、PBFの量、抗PBF抗体の量、またはPBF特異的CTLの量が、正常者のそれらのレベルと比較して2倍以上、好ましくは3倍以上多いことを指標として行うことができる。

#### 【0146】

##### 【実施例】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

#### 【0147】

## 実施例 1

骨肉腫細胞株とそれに対する細胞傷害性T細胞 (CTL) の樹立

骨肉腫患者より生検で取り出された骨肉腫組織から、骨肉腫細胞株を樹立し、OS2000と命名した。同じ骨肉腫患者より採取した血液から、Lymphoprep (Nycomed社)を用いた比重遠心法により末梢血単核球を回収し、放射線照射して不活化したOS2000を10日おきに6回添加して、刺激を加えながら培養した。その後、抗CD8抗体を結合した磁気ビーズ (Macs, Miltenyi社)を用いてCD8陽性の細胞を濃縮し、限界希釈法を用いてCTL株の樹立を行った (Int. J. Cancer, 39, 390-396, 1987, N. Eng. J. Med, 333, 1038-1044, 1995)。OS2000に対する細胞傷害活性を指標に選別を行い、3種類のCTLを得た。その中からTcOS2000c1-303と命名されたCTLを用いてその後の実験を行った。OS2000のHLAクラスI分子のタイプは、HLA-A\*2402、-B\*5502、-B40、Cw1であることを確認した。

【0148】

## 実施例 2

新規な腫瘍抗原タンパク質遺伝子のスクリーニング

## 1) HLA-B55遺伝子導入細胞を用いたスクリーニング

OS2000からFirst track (Invitrogen社)を用いてmRNAを調製した。次にこのmRNAをもとにして、Superscript Choice System for cDNA Synthesis (Gibco-BRL社)を用いてcDNAを作製し、これを発現ベクターpCEP4 (Invitrogen社)に組み込んでcDNAライブラリーを調製した。

また、OS2000細胞からPCRにより単離したHLA-B\*5502遺伝子 (GenBank Acc.No. M77777, J. Immunol., 148(4), 1155-1162(1992)) を293-EBNA細胞 (Invitrogen社)に導入した細胞293-EBNA-B55を準備した。

【0149】

第1回目のスクリーニングとして以下の操作を行った。293-EBNA-B55細胞を96ウェルマイクロプレートにウェル当たり $8 \times 10^4$ 個加え、約100個のcDNAクロンのプール(100~200  $\mu$ g)を、Lipofection法 (Lipofectamine 2000, Invitrogen社)により遺伝子導入した。遺伝子導入に用いたcDNAクロンのプールは別に保存しておいた。24時間後にTcOS2000c1-303細胞を $8 \times 10^4$ 個加えてさらに24時間後

に培養上清を回収し、LDH Cytotoxicity Detection Kit (タカラバイオ) を用い、細胞傷害により遊離したLDHを定量して、CTLの反応性を調べた。1000個のウェルから最も強いCTL反応性が得られたウェル1B9を選択した。次に1B9の遺伝子導入に用いたcDNAクローンプールから調製した400個のcDNAから80個のcDNAクローンプール(プール当たり8~12のcDNAクローンを含む)を用意し、上記と同様に293-EBNA-B55細胞にcDNAクローンプールを遺伝子導入し、TcOS2000cl-303細胞の反応性を指標に第2回目のスクリーニングを行った。その結果、20ウェルに反応性が認められた。さらに20ウェルのcDNAクローンプールからウェル当たり1クロンのcDNAとして上記と同様に293-EBNA-B55細胞にcDNAクローンを遺伝子導入し、TcOS2000cl-303細胞の反応性を指標に第3回目のスクリーニングを行った。その結果4ウェルに反応性が認められた。4ウェルのcDNAの塩基配列を解析したところ、同じcDNAを含んでいることが明らかとなった。このcDNAクローンを1B9.1H4と命名した。

#### 【0150】

##### 2) HLA-A24遺伝子導入細胞を用いたスクリーニング

先のHLA-B\*5502遺伝子の場合と同様にして、HLA-A\*2402遺伝子 (Cancer Res., 55:4248-4252 (1995)、GenBank Accession No.M64740) を 293-EBNA細胞 (Invitrogen社) に導入した細胞293-EBNA-A24を準備した。先の293-EBNA-B55細胞を用いたスクリーニングと同様にスクリーニングを行い、第1回目のスクリーニングで選択したウェル2E4から、第2回目のスクリーニングで22個の反応性のウェルが得られ、第3回目のスクリーニングで4ウェルが選ばれた。4ウェルのcDNAの塩基配列を解析したところ、HLA-B\*5502で選ばれたcDNAクローン1B9.1H4と同じcDNAを含んでいることが明らかとなった。

#### 【0151】

##### 3) cDNAクローン1B9.1H4の解析

1B9.1H4のcDNAを、293-EBNA-B55または293-EBNA-A24に導入して発現させた時のTcOS2000cl-303の反応性を、前述のLDHリリースアッセイ(遊離LDHの定量)により測定した結果を図1に示す。またTcOS2000cl-303の反応性を<sup>51</sup>Crリリースアッセイ (J. Immunol., 159:4753, 1997) により測定した結果を図2に示す。TcOS200

Ocl-303は、cDNAクローン1B9.1H4を導入して発現させた細胞を認識し、特異的に傷害活性を示した。このことより、cDNAクローン1B9.1H4は、TcOS2000c1-303が認識する腫瘍抗原タンパク質の遺伝子をコードしていることが明らかとなった。

#### 【0152】

cDNAクローン1B9.1H4についてBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems社)を使用して塩基配列を決定した。決定された塩基配列を、配列表の配列番号:3に示す。該cDNAの全長は1901塩基対であった。配列番号:3に記載した塩基配列を、公共のデータベースを使用して既知の配列と比較した結果、該cDNAは、GenBank Accession No. AF263928として登録されているパピローマウイルス結合因子(Papillomavirus binding factor:PBF、またPapillomavirus regulatory factor:PRF-1とも称する) (Virology 293,103-117(2002))と大部分が同じ塩基配列を有していた。当該PBFの塩基配列を配列番号:1に、また対応するアミノ酸配列を配列番号:2に、それぞれ示す。

#### 【0153】

次に、PBF自身が先の1B9.1H4と同様の腫瘍抗原タンパク質活性(CTL反応性)を有するか否かを検討した。まず、OS2000細胞から抽出したRNAからcDNAを調製し、配列番号:4および配列番号:5に示すプライマーを用いてPCRを行い、PBFのcDNAを増幅した。増幅断片を発現ベクターpCEP4に組み込んで作製されたPBF遺伝子発現ベクターを、先の293-EBNA-B55または293-EBNA-A24に導入して発現させた時のTcOS2000c1-303の反応性を、LDHリリースアッセイにより測定した。結果を図3及び図4に示す。図より明らかなように、TcOS2000c1-303は、PBF遺伝子発現ベクターを導入して発現させた細胞に対しても傷害活性を示した。このことより、PBFはTcOS2000c1-303が認識する腫瘍抗原タンパク質であることが明らかとなった。

#### 【0154】

##### 実施例3

##### 各種細胞や組織でのPBF遺伝子の発現解析

腫瘍抗原タンパク質PBFをコードする遺伝子の各種細胞や組織での発現を、RT-

PCR法により解析した。各細胞からIsogen reagent (Nippon Gene)を用いて抽出したRNAをもとに、オリゴdTプライマーを用いてcDNAを調製し、配列番号：4および配列番号：5に示すプライマーを用いてPCRを行い、PBFのcDNAを増幅した。その後、この増幅遺伝子を電気泳動で分離し、解析した。陽性コントロールとしてGPDH遺伝子の発現を、前記と同様にRT-PCR法を行い確認した。結果を図5に示す。PBF遺伝子は正常末梢血リンパ球やスクリーニングに使用した293-EBNA細胞では発現が認められなかったが、OS2000を含む多くの肉腫由来の細胞で発現が確認された。

【0155】

【発明の効果】

本発明により、肉腫細胞由来の腫瘍抗原タンパク質およびその遺伝子の、CTLの誘導剤としての用途などが提供される。本発明のCTLの誘導剤は、多くの肉腫患者を処置することができる。

【0156】

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> Sato, Noriyuki

Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.

<120> Tumor antigen proteins and its use

<130> 133016

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

&lt;211&gt; 2068

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

ctgcacaggg agtttgtctt gtgcaaaca tttccaaggc agcgttttct tccctgcctg 60  
ggagtgcagg gctcagcgcc ttcactttgg aactgactca gagacctaaa gaagcccacc 120  
tggccagcgg gaagggggggc cgccgccgcc tcccggtttt gggcagccct ggccagctcc 180  
ctgtggcctt ggaggacttc caccgggcag gcgttcccat gatgccaggc taccaggcgc 240  
gggggattcc tgcaggccgg cgctgctttt cttagaacct cttttctaga aaagtacacc 300  
tggaggtttt gcttcaaaga gaggagaggc agcagcatgg cgagtgtcct gtcccgacgc 360  
cttggaaagc ggtccctcct gggagcccgg gtgttgggac ccagtgcctc ggagggggccc 420  
tcggctgccc caccctcgga gccactgcta gaagggggccg ctcccagcc tttcaccacc 480  
tctgatgaca ccccctgcca ggagcagccc aaggaagtcc ttaaggctcc cagcacctcg 540  
ggccttcagc aggtggcctt tcagcctggg cagaaggttt atgtgtggta cgggggtcaa 600  
gagtgcacag gactggtgga gcagcacagc tggatggagg gtcaggtgac cgtctggctg 660  
ctggagcaga agctgcaggt ctgctgcagg gtggaggagg tgtggctggc agagctgcag 720  
ggcccctgtc cccaggcacc acccctggag cccggagccc aggccctggc ctacaggccc 780  
gtctccagga acatcgatgt cccaaagagg aagtcggacg cagtggaaat ggatgagatg 840  
atggcggcca tgggtgctgac gtccctgtcc tgcagccctg ttgtacagag tcctcccggg 900  
accgaggcca acttctctgc ttcccgtgcg gcctgcgacc catggaagga gagtgggtgac 960  
atctcggaca gcggcagcag cactaccagc ggtcactgga gtgggagcag tgggtgtctcc 1020  
accccctcgc cccccaccc ccaggccagc cccaagtatt tgggggatgc ttttggttct 1080  
ccccaaactg atcatggctt tgagaccgat cctgaccctt tcctgctgga cgaaccagct 1140  
ccacgaaaaa gaaagaactc tgtgaaggtg atgtacaagt gcctgtggcc aaactgtggc 1200  
aaagtctcgc gctccattgt gggcatcaaa cgacacgtca aagccctcca tctgggggac 1260  
acagtggact ctgatcagtt caagcgggag gaggatttct actacacaga ggtgcagctg 1320  
aaggaggaat ctgctgctgc tgctgctgct gctgccgcag gcaccccagt ccctgggact 1380  
cccacctccg agccagctcc cccccagc atgactggcc tgcctctgtc tgctcttcca 1440

ccacctctgc acaaagccca gtcctccggc ccagaacatc ctggcccgga gtcctccctg 1500  
 ccctcagggg ctctcagcaa gtcagctcct gggtccttct ggcacattca ggcagatcat 1560  
 gcataccagg ctctgccatc cttccagatc ccagtctcac cacacatcta caccagtgtc 1620  
 agctgggctg ctgccccctc cgccgcctgc tctctctctc cggtcggag ccggtcgcta 1680  
 agcttcagcg agccccagca gccagcacct gcgatgaaat ctcatctgat cgtcacttct 1740  
 ccaccccggg cccagagtgg tgccaggaaa gcccgagggg aggctaagaa gtgccgcaag 1800  
 gtgtatggca tcgagaccg ggaccagtgg tgcacggcgt gccggtggaa gaaggcctgc 1860  
 cagcgctttc tggactgagc tgtgctgcag gttctactct gttcctggcc ctgccggcag 1920  
 ccaactgacaa gaggccagtg tgtcaccagc cctcagcaga aaccgaaaga gaaagaacgg 1980  
 aaacacggag tttgggctct gttggctaag gtgtaacact taaagcaatt ttctccatt 2040  
 gtgcgaacat tttatTTTTT aaaaaaaaaa 2068

<210> 2

<211> 513

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Ser Val Leu Ser Arg Arg Leu Gly Lys Arg Ser Leu Leu Gly

1

5

10

15

Ala Arg Val Leu Gly Pro Ser Ala Ser Glu Gly Pro Ser Ala Ala Pro

20

25

30

Pro Ser Glu Pro Leu Leu Glu Gly Ala Ala Pro Gln Pro Phe Thr Thr

35

40

45

Ser Asp Asp Thr Pro Cys Gln Glu Gln Pro Lys Glu Val Leu Lys Ala

50

55

60

Pro Ser Thr Ser Gly Leu Gln Gln Val Ala Phe Gln Pro Gly Gln Lys  
65 70 75 80

Val Tyr Val Trp Tyr Gly Gly Gln Glu Cys Thr Gly Leu Val Glu Gln  
85 90 95

His Ser Trp Met Glu Gly Gln Val Thr Val Trp Leu Leu Glu Gln Lys  
100 105 110

Leu Gln Val Cys Cys Arg Val Glu Glu Val Trp Leu Ala Glu Leu Gln  
115 120 125

Gly Pro Cys Pro Gln Ala Pro Pro Leu Glu Pro Gly Ala Gln Ala Leu  
130 135 140

Ala Tyr Arg Pro Val Ser Arg Asn Ile Asp Val Pro Lys Arg Lys Ser  
145 150 155 160

Asp Ala Val Glu Met Asp Glu Met Met Ala Ala Met Val Leu Thr Ser  
165 170 175

Leu Ser Cys Ser Pro Val Val Gln Ser Pro Pro Gly Thr Glu Ala Asn  
180 185 190

Phe Ser Ala Ser Arg Ala Ala Cys Asp Pro Trp Lys Glu Ser Gly Asp  
195 200 205



Ile Ser Asp Ser Gly Ser Ser Thr Thr Ser Gly His Trp Ser Gly Ser  
210 215 220

Ser Gly Val Ser Thr Pro Ser Pro Pro His Pro Gln Ala Ser Pro Lys  
225 230 235 240

Tyr Leu Gly Asp Ala Phe Gly Ser Pro Gln Thr Asp His Gly Phe Glu  
245 250 255

Thr Asp Pro Asp Pro Phe Leu Leu Asp Glu Pro Ala Pro Arg Lys Arg  
260 265 270

Lys Asn Ser Val Lys Val Met Tyr Lys Cys Leu Trp Pro Asn Cys Gly  
275 280 285

Lys Val Leu Arg Ser Ile Val Gly Ile Lys Arg His Val Lys Ala Leu  
290 295 300

His Leu Gly Asp Thr Val Asp Ser Asp Gln Phe Lys Arg Glu Glu Asp  
305 310 315 320

Phe Tyr Tyr Thr Glu Val Gln Leu Lys Glu Glu Ser Ala Ala Ala Ala  
325 330 335

Ala Ala Ala Ala Ala Gly Thr Pro Val Pro Gly Thr Pro Thr Ser Glu  
340 345 350

Pro Ala Pro Thr Pro Ser Met Thr Gly Leu Pro Leu Ser Ala Leu Pro  
355 360 365

Pro Pro Leu His Lys Ala Gln Ser Ser Gly Pro Glu His Pro Gly Pro  
370 375 380

Glu Ser Ser Leu Pro Ser Gly Ala Leu Ser Lys Ser Ala Pro Gly Ser  
385 390 395 400

Phe Trp His Ile Gln Ala Asp His Ala Tyr Gln Ala Leu Pro Ser Phe  
405 410 415

Gln Ile Pro Val Ser Pro His Ile Tyr Thr Ser Val Ser Trp Ala Ala  
420 425 430

Ala Pro Ser Ala Ala Cys Ser Leu Ser Pro Val Arg Ser Arg Ser Leu  
435 440 445

Ser Phe Ser Glu Pro Gln Gln Pro Ala Pro Ala Met Lys Ser His Leu  
450 455 460

Ile Val Thr Ser Pro Pro Arg Ala Gln Ser Gly Ala Arg Lys Ala Arg  
465 470 475 480

Gly Glu Ala Lys Lys Cys Arg Lys Val Tyr Gly Ile Glu His Arg Asp  
485 490 495

Gln Trp Cys Thr Ala Cys Arg Trp Lys Lys Ala Cys Gln Arg Phe Leu  
500 505 510

Asp

<210> 3

<211> 1901

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

ggctggcaga gctgcagggc ccctgtcccc aggcaccacc cctggagccc ggagcccagg 60  
ccctggccta caggcccgtc tcaggaaca tcgatgtccc aaagaggaag tcggacgcag 120  
tggaatgga tgagatgatg gcggccatgg tgctgacgtc cctgtcctgc agccctgttg 180  
tacagagtcc tcccgggacc gaggccaact tctctgttcc ccgtgcggcc tgcgacccat 240  
ggaaggagag tgggtgacatc tcggacagcg gcagcagcac taccagcggg cactggagtg 300  
ggagcagtgg tgtctccacc ccctcgtccc cccaccccca ggccagcccc aagtatttgg 360  
gggatgcttt tggttctccc caaactgatc atggctttga gaccgatcct gaccctttcc 420  
tgctggacga accagctcca cgaaaaagaa agaactctgt gaaggtgatg tacaagtgcc 480  
tgtggccaaa ctgtggcaaa gttctgcgct ccattgtggg catcaaacga cagtcгааag 540  
ccctccatct gggggacaca gtggactctg atcagttcaa gcgggaggag gatttctact 600  
acacagaggt gcagctgaag gaggaatctg ctgctgctgc tgctgctgct gccgcaggca 660  
ccccagtccc tgggactccc acctccgagc cagctccac cccagcatg actggcctgc 720  
ctctgtctgc tcttccacca cctctgcaca aagcccagtc ctccggccca gaacatcctg 780  
gcccggagtc ctccctgccc tcaggggctc tcagcaagtc agctcctggg tccttctggc 840  
acattcaggc agatcatgca taccaggctc tgccatcctt ccagatccca gtctcaccac 900  
acatctacac cagtgtcagc tgggctgctg cccctccgc cgcctgctct ctctctccgg 960  
tccggagccg gtcgctaagc ttcagcgagc cccagcagcc agcacctgcg atgaaatctc 1020  
atctgatcgt cacttctcca cccggggccc agagtgggtgc caggtgagat gtccgctgtc 1080  
gtccccctgcc ttctggtttc tgtgccctgt ctccagtggc gtggactccg accccaccca 1140  
gatgaagtca ccagggttag tccccagaga ggagcccaga tggcggatgc nccagatggg 1200

atgactgttt ggtcctcaga gcctctggcc cctggtcctg gtgacttttg ccgggagctg 1260  
cccccttggc ctctgcttgt tctcccagcc ccacttggcc actctcctgg gccaccacc 1320  
tgtgtggggc tcgatttgca ttcctctctt tctgcaggaa agcccagagg gaggctaaga 1380  
agtgccgcaa ggtgtatggc atcgagcacc gggaccagtg gtgcacggcg tgccggtgga 1440  
agaaggcctg ccagcgcttt ctggactgag ctgtgctgca ggttctactc tgttcctggc 1500  
cctgccggca gccactgaca agaggccagt gtgtcaccag ccctcagcag aaaccgaaag 1560  
agaaagaacg gaaacacgga gtttgggctc tgttggctaa ggtgtaacac ttaaagcaat 1620  
tttctcccat tgtgcgaaca ttttattttt taaaaaaaag aaacaaaaat atttttcccc 1680  
ctaaaatagg agagagccaa aactgaccaa ggctattcag cagtgaacca gtgaccaaag 1740  
aattaattac cctccgtttc ccacatcccc actctctagg ggattagctt gtgcgtgtca 1800  
aaagaaggaa cagctcggtc tgcttcctgc tgagtcgggtg aattctttgc tttctaaact 1860  
cttccagaaa ggactgtgag caagatgaat ttacttttct t 1901

<210> 4

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 4

tactagctag ctaaggcagc agcatggcga gtg

33

<210> 5

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 5

aaatatgcgg ccgcggccag gaacagagta gaac

34

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 6

Ala Tyr Arg Pro Val Ser Arg Asn Ile

1

5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 7

Asp Phe Tyr Tyr Thr Glu Val Gln Leu

1

5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 8

Gly Phe Glu Thr Asp Pro Asp Pro Phe

1

5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 9

Lys Tyr Leu Gly Asp Ala Phe Gly Ser

1

5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 10

Arg Ser Leu Leu Gly Ala Arg Val Leu

1

5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 11

Ala Ala Pro Pro Ser Glu Pro Leu Leu

1

5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 12

Ile Tyr Thr Ser Val Ser Trp Ala Ala

1

5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 13

Thr Val Trp Leu Leu Glu Gln Lys Leu

1

5



<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 14

His Pro Gln Ala Ser Pro Lys Tyr Leu

1

5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 15

Leu Ser Pro Val Arg Ser Arg Ser Leu

1

5

<210> 16 .

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 16

Met Tyr Lys Cys Leu Trp Pro Asn Cys

1

5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 17

Leu Trp Pro Asn Cys Gly Lys Val Leu

1

5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 18

Cys Gln Glu Gln Pro Lys Glu Val Leu

1

5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 19

Ala Ala Pro Ser Ala Ala Cys Ser Leu

1

5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 20

Glu Gly Gln Val Thr Val Trp Leu Leu

1

5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 21

Met Ala Ala Met Val Leu Thr Ser Leu

1

5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 22

Gly Pro Cys Pro Gln Ala Pro Pro Leu

1

5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 23

Ala Pro Thr Pro Ser Met Thr Gly Leu

1

5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 24

Arg Trp Lys Lys Ala Cys Gln Arg Phe  
1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 25

Ser Ala Ala Pro Pro Ser Glu Pro Leu  
1 5

【図面の簡単な説明】

【図 1】

1B9.1H4のcDNAを、293-EBNA-B55または293-EBNA-A24に導入して発現させた時のCTL (TcOS2000c1-303) の反応性を、LDHリリースアッセイにより測定した結果を示したグラフである。図中、横軸は490nmの吸光度を示す。

【図 2】

1B9.1H4のcDNAを、293-EBNA-B55または293-EBNA-A24に導入して発現させた時のTcOS2000c1-303の反応性を $^{51}\text{Cr}$ リリースアッセイにより測定した結果を示したグラフである。a)は293-EBNA-A24細胞を用いた時の結果を、またb)は293-EBNA-B55細胞を用いた時の結果を示す。図中、横軸はE/T比を、また縦軸は細胞傷害性活性を示す。

【図 3】

1B9.1H4またはPBF遺伝子を、293-EBNA-A24に導入して発現させた時のCTL (TcOS2000c1-303) の反応性を、LDHリリースアッセイにより測定した結果を示したグラフである。図中、横軸は490nmの吸光度を示す。

【図 4】

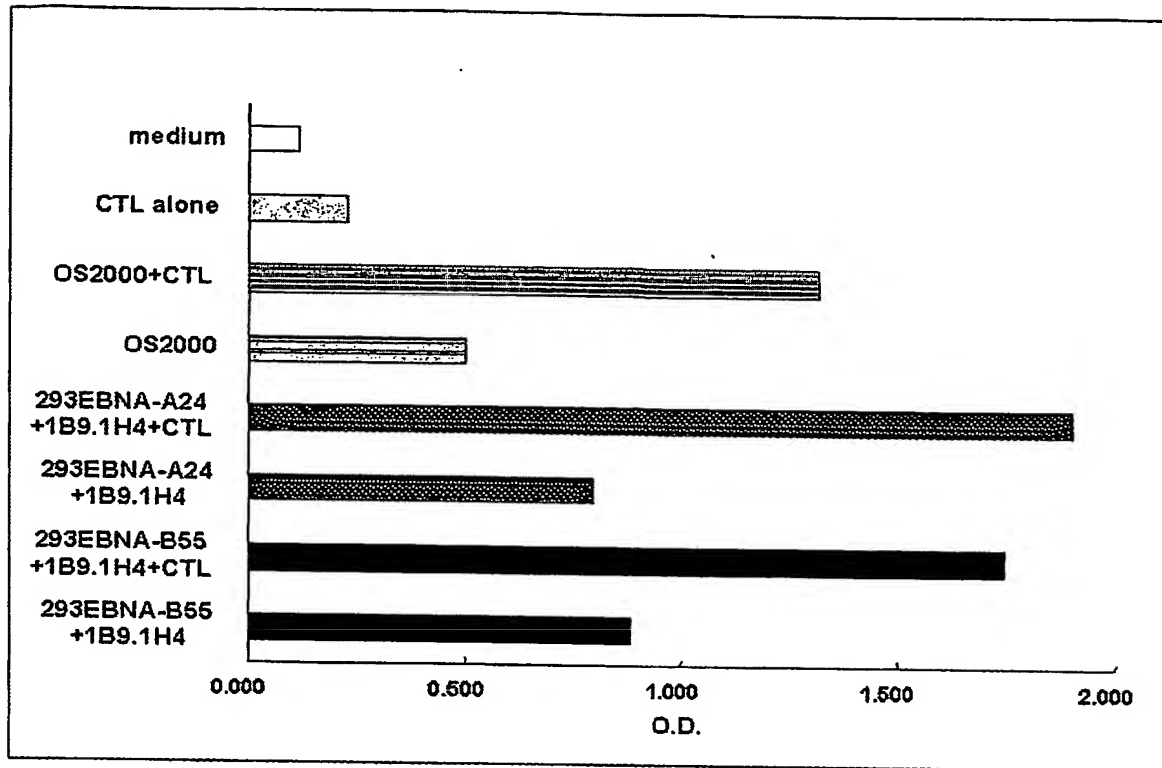
1B9.1H4またはPBF遺伝子を、293-EBNA-B55に導入して発現させた時のCTL (TcOS2000c1-303) の反応性を、LDHリリースアッセイにより測定した結果を示したグラフである。図中、横軸は490nmの吸光度を示す。

【図 5】

腫瘍抗原タンパク質PBFをコードする遺伝子の各種細胞での発現を、RT-PCRにより解析した結果を示す図である。図中、OS2000は骨肉種細胞株を、PBLは正常末梢血リンパ球を、EB-BはEBVトランスフォームB細胞を、K562は慢性骨髄性白血病細胞株を、293EBNAはアデノウイルスでトランスフォームしたヒト腎細胞株を指す。図中、SaOS、HOS、KIKU、Huo9およびNYは骨肉腫細胞株を指す。図中、HS-SYII、SW982およびFujiは滑膜肉腫細胞株を指す。図中、HT1080は線維肉腫細胞株を指す。図中、HS729T、A204およびRDは横紋筋肉腫細胞株を指す。また図中、A673、W-ES、NCR-EW2、SCCH196、SK-ES1およびRD-ES1はユーイング肉腫細胞株を指す。PBF遺伝子の発現結果を上段に、また陽性コントロールであるG3PDH遺伝子の発現結果を下段に、それぞれ示す。

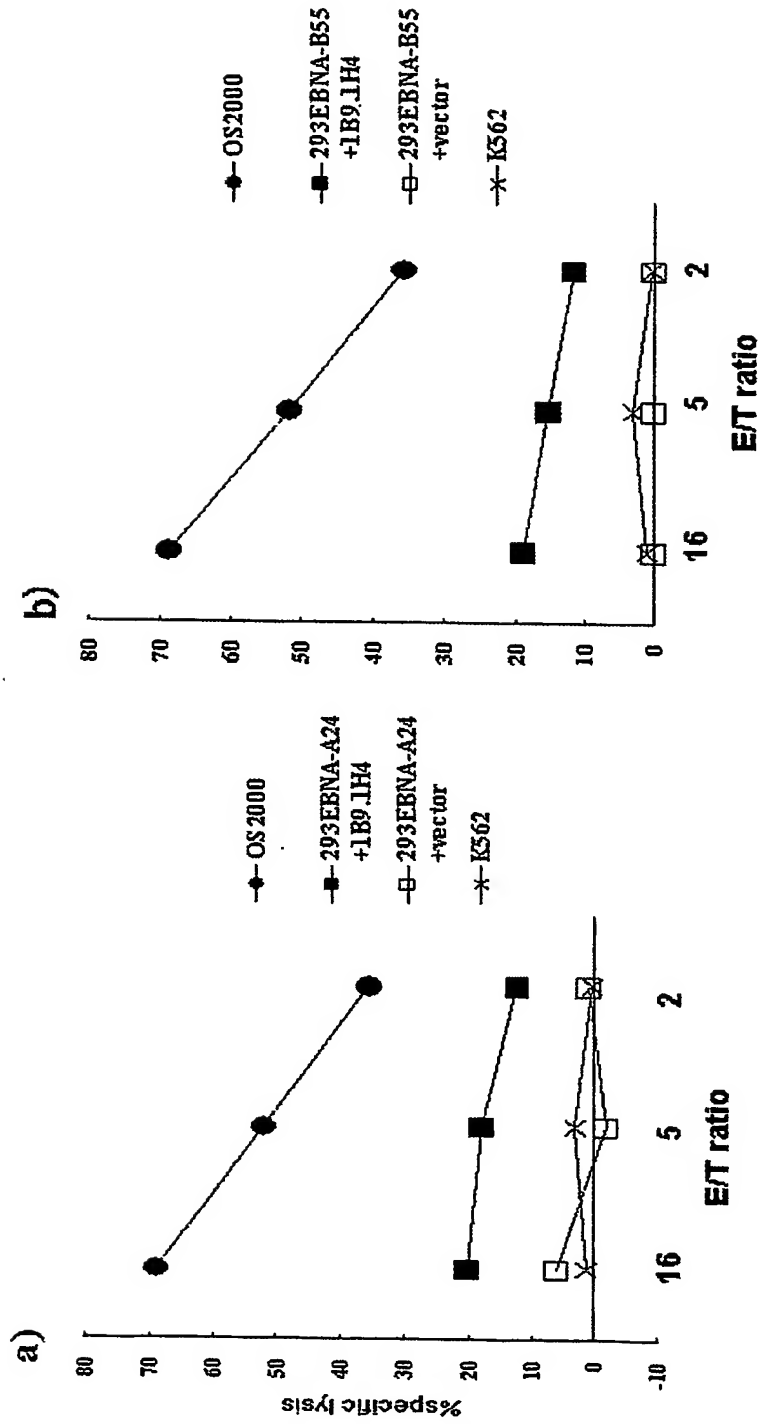
【書類名】 図面

【図 1】

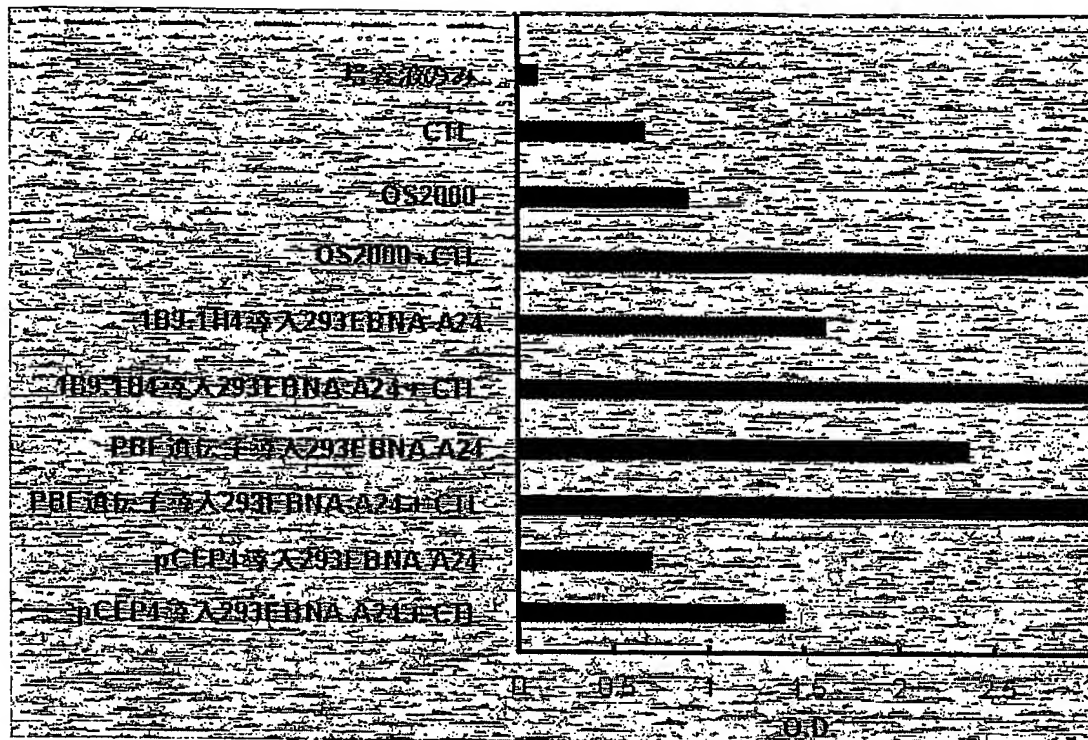




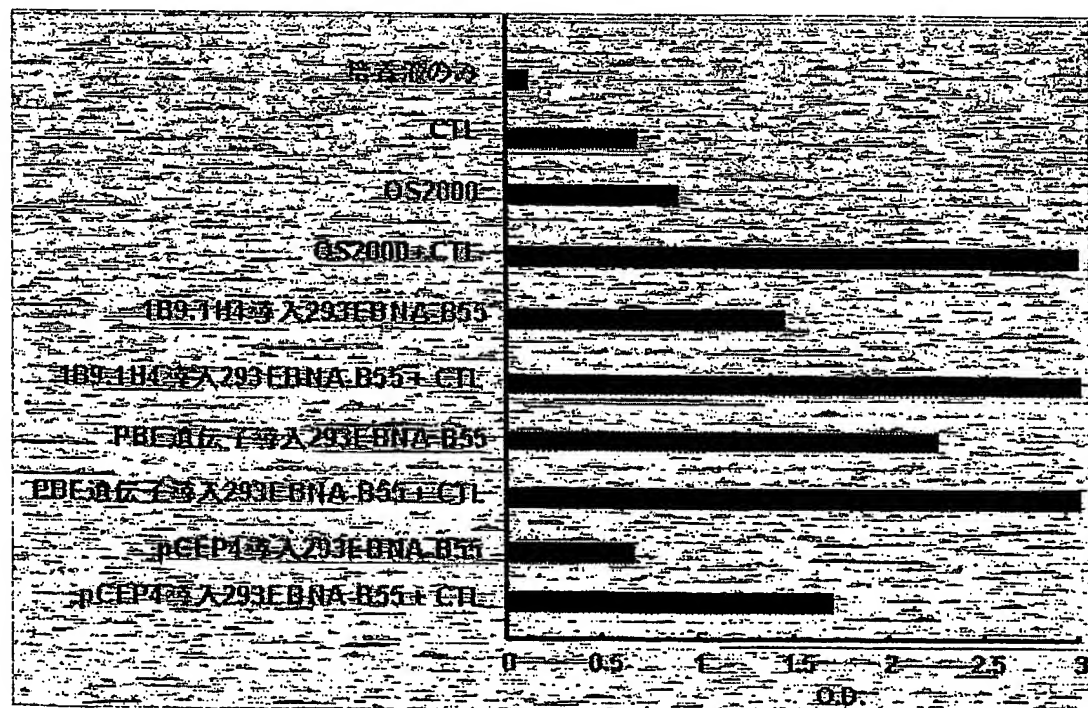
【図 2】



【図 3】



【図 4】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 肉腫細胞由来の腫瘍抗原タンパク質およびその遺伝子の、CTLの誘導剤としての用途などを提供すること。

【解決手段】 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質を有効成分として含有してなるCTLの誘導剤等。

【選択図】 なし

認定・付加情報

|         |                          |
|---------|--------------------------|
| 特許出願の番号 | 特願 2 0 0 2 - 2 8 2 3 4 5 |
| 受付番号    | 5 0 2 0 1 4 4 9 3 3 0    |
| 書類名     | 特許願                      |
| 担当官     | 第五担当上席 0 0 9 4           |
| 作成日     | 平成 1 4 年 1 0 月 2 日       |

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成14年 9月27日

次頁無

特願 2 0 0 2 - 2 8 2 3 4 5

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[ 0 0 0 1 8 3 3 7 0 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 9 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区道修町 2 丁目 2 番 8 号

氏 名

住友製薬株式会社

特願2002-282345

出願人履歴情報

識別番号

[502351224]

1. 変更年月日  
[変更理由]

2002年 9月27日

住 所  
氏 名

新規登録

北海道札幌市豊平区福住2条9丁目13-3

佐藤 昇志

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**